

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Orgánica I



TESIS DOCTORAL

**De péptidos a peptidomiméticos en la búsqueda de inhibidores
novedosos de la tripanotión reductasa de *Leishmania infantum* (Li-
TryR)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

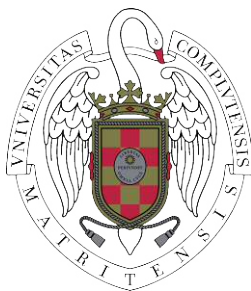
PRESENTADA POR

Marta Ruiz-Santa Quiteria Saavedra

Directoras

**Sonsoles Velázquez Díaz
María José Camarasa Ríos**

Madrid, 2017



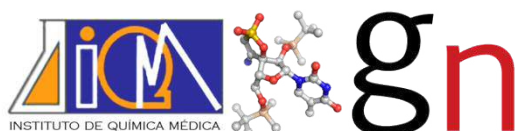
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Orgánica I

Tesis Doctoral

**DE PÉPTIDOS A PEPTIDOMIMÉTICOS EN LA
BÚSQUEDA DE INHIBIDORES NOVEDOSOS DE
LA TRIPANOTIÓN REDUCTASA DE *LEISHMANIA*
INFANTUM (Li-TryR)**

Marta Ruiz-Santa Quiteria Saavedra

Instituto de Química Médica (CSIC)
Madrid, 2016



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el grupo de investigación *Nucleósidos y análogos como fuente de moléculas bioactivas* del Instituto de Química Médica (CSIC), bajo la dirección de la Dra. Sonsoles Velázquez y de la Dra. María José Camarasa, dentro del marco de los proyectos SAF2009-13194-C02-01 y SAF2012-39760-C02-01, financiados por el Ministerio de Economía y Competitividad, y del proyecto BIPEDD-CM-S2010/BMD-2457, financiado por la Comunidad de Madrid.

La autora agradece a la empresa farmacéutica *GlaxoSmithKline* el premio otorgado en la XVI Convocatoria de Premios para Investigadores Noveles de la Sociedad Española de Química Terapéutica. El trabajo recogido en este premio es parte de lo reflejado en el Capítulo 1 de la presente Tesis Doctoral.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis dos directoras la oportunidad que me han brindado de realizar esta Tesis Doctoral con ellas, por permitir que me introdujera en el mundo de la Química Médica que tanto me gusta y por ofrecerme mi primer contrato, que nunca olvidaré. A Sonsoles, gracias por enseñarme todo lo que sabías, por estar pendiente de mí todos los días en el laboratorio y por comprenderme y ayudarme cuando la química me desesperaba. La etapa de escritura ha sido complicada y especialmente difícil para ti por no poder estar en el Instituto, pero aun así te agradezco la enorme implicación que has demostrado, incluso abriéndome las puertas de tu casa. A María José, gracias por ayudarme tanto, sobre todo en esta última etapa de escritura. Por tener tanta paciencia conmigo y entenderme cuando los plazos me agobiaban. Gracias por confiar en mí desde el primer momento y por ser un ejemplo inmejorable.

Me gustaría agradecer también a todos los grupos con los que hemos colaborado. Al grupo del Dr. Antonio Jiménez, a Héctor y a Miguel, por la realización de los ensayos biológicos, a la Dra. María Ángeles Jiménez por la realización de la RMN de los péptidos y al grupo del Dr. Juan Hermoso, en especial a Rocío y a Alejandra, por los estudios cristalográficos. Quisiera agradecer especialmente al Dr. Federico Gago la oportunidad de trabajar en su laboratorio durante un tiempo, así como, la cercanía que siempre me ha mostrado. También a Pedro Sánchez por enseñarme esas nociones básicas sobre modelado molecular y por tener tanta paciencia conmigo. Ha sido un placer continuar tu trabajo.

Quisiera agradecer a la empresa farmacéutica GlaxoSmithKline la concesión del premio en la XVI convocatoria de premios para investigadores noveles de la Sociedad Española de Química Terapéutica en el año 2013. Parte del trabajo recogido en este premio se incluye en el Capítulo 1 de esta Tesis Doctoral.

A todos los servicios de mi Centro e Instituto, al laboratorio de Masas y RMN. A Guada y a Felipe por la realización de los HPLC y por la purificación de algunas de mis moléculas en el HPLC semipreparativo, especialmente difíciles en algunas ocasiones.

A todo mi grupo de nucleósidos. A María Jesús, Ernesto, Eva y Ana por su ayuda durante estos años, especialmente en los seminarios de grupo, ya que todos sus consejos y comentarios han sido muy enriquecedores. A Eva, Gloria, Nacho, Lole... A Oskía, porque además de ser una "vecina" estupenda de laboratorio haces que nuestras clases de inglés los viernes por la tarde sean menos duras. A Alba, por esos consejos que siempre me dabas y por iniciarme en el mundo de la repostería. A Sonia, por ser tan detallista y estar siempre tan pendiente de todos. A Belén, por ser tan servicial. A Asier, por estar siempre dispuesto a sacar una sonrisa.

Muy especialmente, querría acordarme de todos con los que he compartido laboratorio y con los que he pasado momentos buenos y no tan buenos. A Silvia, que aunque coincidimos poco tiempo me enseñaste todo lo que sabías de péptidos. A Aida, con la que compartí muchos momentos, gracias por ayudarme tanto con la química y por ser tan cercana conmigo. A Filipa, por esa alegría que siempre traías al laboratorio. A Ana, por ayudarme también con la síntesis de algunos productos. A Alejandro y a Andrés, que todavía hoy, me siguen aguantando. A Alejandro, por traer al laboratorio esas ganas inmensas de trabajar, de querer probar y hacer cosas, y sobre todo por animarme tanto, poniéndome música y vídeos con los que tanto nos reímos. A Andrés, porque en todo el tiempo que hemos estado juntos siempre me has ayudado, y no sólo con mis reacciones sino también con tus consejos y ánimos cuando no tenía el mejor día, y por enseñarme que “me quejo mucho pa’ lo joven que soy”...jajaja. Guardaré siempre tu pinza con mucho cariño.

A todos los miembros de mi Instituto de Química Médica con los que he compartido todos estos años y que con muchos de ellos me he iniciado en el mundo de organizar congresos. A Paula, Mario, M. Ángeles, Pedro, Paco, Clara, Martín, Laura... A Pili y a Bea, porque nunca olvidaré esa escuela de verano y el “protein-protein interaction...”. A mis compañeros de tupper: a Ana, Irene, Alejandro, Andrés, Lole, Alba, Silvia, Aida, Dani... A Jose y a Felipe, por sacarme siempre una sonrisa en las horas de la comida, aunque no tuviera un buen día, muchas gracias.

A mis amigos de la Facultad, a Alberto, Elena, Marta, Yanhi, Estefanía, María, Ann, Marina...

Y a mis amigas de siempre, Bea, Esther, Nuria, Marta y Zara, por estar siempre ahí.

Finalmente, quisiera acordarme de mi familia. A mis abuelos, mis tíos y muy especialmente a mi hermano y a mis padres. A Carlos, porque no puede haber un hermano mejor. A mis padres, Pilar y Valentín, por haber sido siempre un ejemplo a seguir para mí. Me siento muy orgullosa de haber seguido vuestros pasos y sólo puedo agradecerlos todo lo que habéis hecho siempre por mí.

Y dejo para el final a una de las personas más importantes de mi vida, a Alex. Por haberme apoyado tanto siempre, especialmente en esta última etapa tan difícil. Por haberme aguantado y por haber estado siempre conmigo, son ya muchos años juntos, creciendo personal y profesionalmente. Gracias por hacerme las cosas más fáciles siempre.

ÍNDICE

Nota sobre nomenclatura	i
Nota sobre puntuación	i
L-aminoácidos y nomenclatura utilizada en RMN	ii
Abreviaturas empleadas	iii
Abstract	v

I.1. INTRODUCCIÓN	1
I.1.1. Ciclo vital de <i>Leishmania</i>	4
I.1.2. Tratamiento de la leishmaniasis en la actualidad.....	5
I.1.3. Diferencias en el metabolismo redox de los protozoos y de los mamíferos	7
I.1.4. Estructura de la Tripanotión reductasa de <i>Leishmania infantum</i> (<i>Li</i> -TryR).....	8
I.1.5. Inhibidores de la Tripanotión reductasa (TryR)	10
I.2. ANTECEDENTES.....	13
I.2.1. Inhibición del proceso de dimerización de la <i>Li</i> -TryR.....	15
I.2.2. Peptidomiméticos en la búsqueda de inhibidores de interacciones proteína-proteína	18
I.3. OBJETIVOS GENERALES	23
I.4.BIBLIOGRAFÍA.....	27

CAPÍTULO 1: PÉPTIDOS LINEALES, PÉPTIDOS CÍCLICOS Y FOLDÁMEROS

1.1. Péptidos lineales (Serie1).....	40
1.1.1. Síntesis de los péptidos lineales.....	41
1.1.2. Evaluación biológica de los péptidos lineales	44
1.2. Péptidos cíclicos (Serie 2).....	47
1.2.1. Diseño de los péptidos cíclicos.....	50

1.2.2. Síntesis de los péptidos cíclicos	51
1.2.3. Estudios estructurales	69
1.2.3.1. Estudios estructurales de dicroísmo circular	69
1.2.3.2. Estudios estructurales de simulación molecular	74
1.2.4. Evaluación biológica de los péptidos cíclicos.....	78
1.3. Foldámeros (Serie 3)	82
1.3.1. Diseño de los péptidos- α/β	84
1.3.2. Síntesis de los péptidos- α/β	85
1.3.3. Evaluación biológica de los péptidos- α/β	90
1.4. Estudios de estabilidad proteolítica	91
1.5. Conclusiones	93
1.6. Bibliografía	95

CAPÍTULO 2: CONJUGADOS DE PÉPTIDOS Y PEPTIDOMIMÉTICOS CON SONDAS FLUORESCENTES Y/O PÉPTIDOS DE PENETRACIÓN CELULAR..... 105

2.1. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad leishmanicida y citotóxica de los péptidos lineales, péptidos cíclicos y foldámeros más representativos	107
2.2. Estudios de internalización mediante microscopía confocal de los compuestos marcados con sondas fluorescentes	109
2.3. Conjugados de péptidos y peptidomiméticos con péptidos de penetración celular (CPPs)	116
2.3.1. Síntesis y actividad leishmanicida de los conjugados 2.07-2.15	116
2.3.2. Ensayos de internalización del conjugado [fluoresceína]-[1.01]-[RRRRRRRRR] (2.16).....	122
2.4. Conclusiones	126
2.5. Bibliografía	128

CAPITULO 3: PEPTIDOMIMETICOS DE NATURALEZA NO PEPTIDICA.....	135
3.1. Estudio de la interfaz de dimerización	138
3.1.1. Análisis de las contribuciones hidrófobas y electrostáticas	138
3.1.2. Análisis de la superficie y volumen de la interfaz de dimerización	139
3.2. Definición del modelo de farmacóforo	141
3.3. Miméticos estructurales no peptídicos de hélices α	143
3.3.1. Síntesis de la pirrolopirimidina 3.01	148
3.3.2. Diseño y síntesis de pirrolopirimidinas modificadas en la posición 2	159
3.3.3. Evaluación biológica de las pirrolopirimidinas	163
3.4. Inhibidores no peptídicos obtenidos mediante cribado virtual	164
3.4.1. Obtención de los “hits” virtuales de las bases de datos del NCI y del IQM ...	166
3.4.2. Evaluación biológica.....	171
3.4.2.1. Evaluación de la actividad enzimática de la <i>Li</i> -TryR.....	171
3.4.2.2. Evaluación del proceso de dimerización de la <i>Li</i> -TryR	173
3.5. Conclusiones	174
3.6. Bibliografía	176
 4. CONCLUSIONES GENERALES	 181
 5. PARTE EXPERIMENTAL	 187
5.1. Métodos generales	189
5.2. Productos comerciales.....	192
5.3. Protocolos generales de síntesis en fase sólida	194
5.3.1. Seguimiento de las reacciones	195
5.3.2. Elongación de la cadena peptídica	196
5.3.3. Acetilación de las aminas del extremo <i>N</i> -terminal	196

5.3.4. Eliminación de los grupos protectores aliloxycarbonilo (Alloc) y alilo (OAl)....	197
5.3.5. Eliminación de los grupos protectores fenilisopropilo (PhiPr) y monometoxitritilo (Mmt)	197
5.3.6. Desanclaje de la resina y sedimentación de los péptidos	197
5.3.7. Purificación de los péptidos	197
5.4. Síntesis y caracterización de los péptidos lineales, cíclicos y foldámeros...	198
5.4.1. Síntesis de los péptidos lineales (Serie 1) (1.01, 1.03, 1.04, 1.06).....	198
5.4.2. Síntesis de los péptidos cíclicos y de sus precursores lineales (Serie 2)	201
5.4.3. Síntesis de los foldámeros (Serie 3) (1.45-1.53)	213
5.4.4. Síntesis de los péptidos portadores de sondas fluorescentes (2.03 y 2.04)..	217
5.4.5. Síntesis del foldámero conjugado con un péptido transportador (2.10).....	220
5.5. Síntesis y caracterización de peptidomiméticos de naturaleza no peptídica	221
5.5.1. Síntesis de 2-alkil-4,6-dicloroaminopiridina-5-carbaldehidos en disolución (3.26-3.27, 3.32-3.35).....	221
5.5.2. Síntesis de pirrolopirimidinas en fase sólida (3.01, 3.36-3.38)	223
5.5.3. Síntesis en fase sólida de 2-metiltio- y 2-metilsulfonil- pirrolopirimidinas intermedias 3.14 y 3.22	227
5.6. Síntesis en disolución de los compuestos resultantes del cribado virtual ...	229
5.7. Métodos computacionales	236
5.7.1. Métodos de simulación de dinámica molecular.....	236
5.7.2. Cribado virtual	238
5.8. Dicroísmo circular	239
5.9. Ensayos de estabilidad proteolítica	239
5.10. Ensayos biológicos	240
5.10.1. Ensayo de inhibición de la actividad oxidoreductasa de la <i>Li-TryR</i>	240
5.10.2. Ensayo de inhibición de la dimerización de la <i>Li-TryR</i>	241
5.10.3. Ensayos frente a los parásitos.....	242
5.11. Bibliografía	243

NOTA SOBRE NOMENCLATURA

A lo largo de esta Memoria se han utilizado la nomenclatura y simbolismos de aminoácidos recomendados por la Comisión de Nomenclatura de Bioquímica (JCBN) de la IUPAC-IUB ("Nomenclature and Symbolism for Aminoacids and Peptides", *Pure & Appl. Chem.* **1984**, 56, 595-674. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/AminoAcid>)

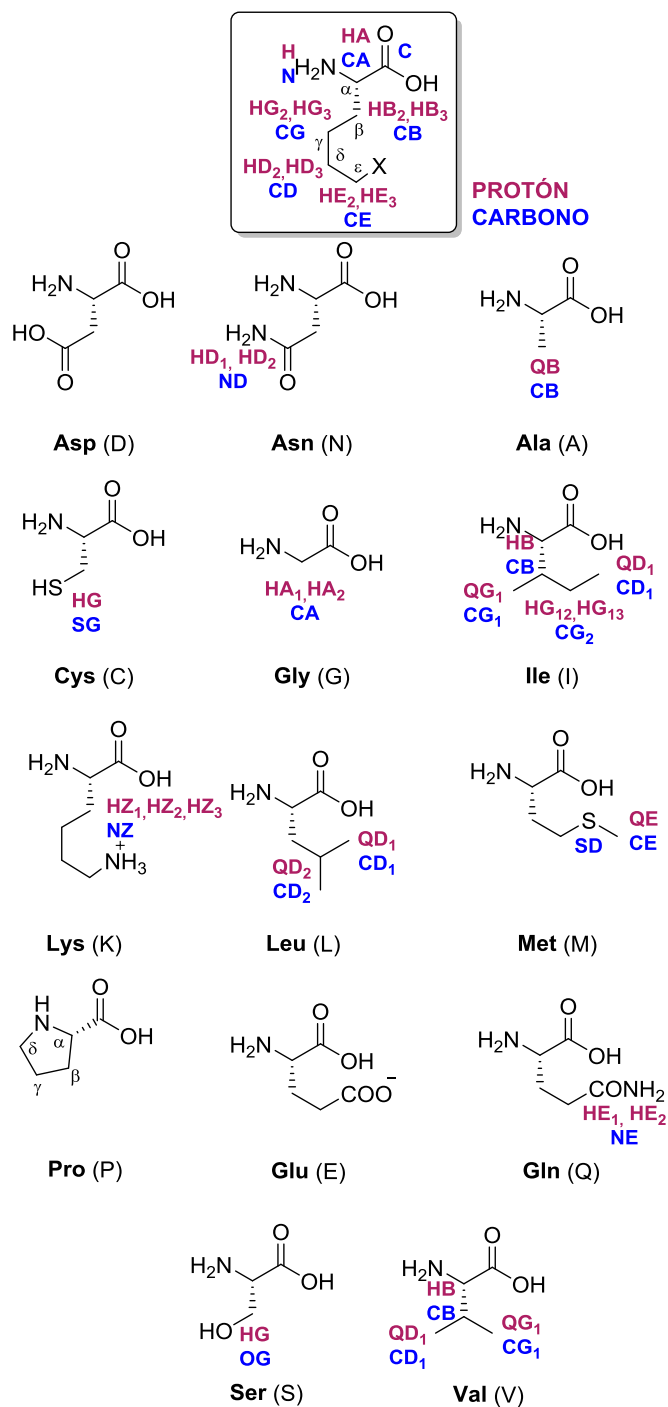
Los aminoácidos se han nombrado por el sistema de código de una y de tres letras y pertenecen a la serie natural L, salvo que se indique lo contrario. Las sustituciones en el grupo α -NH₂ se indican anteponiendo el símbolo aceptado para el sustituyente al símbolo del aminoácido mientras que las sustituciones en los grupos funcionales de las cadenas laterales se indican entre paréntesis, inmediatamente después del símbolo del aminoácido.

En cuanto a los péptidos, el residuo que tiene el grupo amino libre, o no acilado por otro aminoácido, se denomina N-terminal y el que tiene el grupo carboxilo libre se denomina C-terminal. Tanto para nombrarlos como para representarlos gráficamente, se comienza por el residuo N-terminal, seguido de los aminoácidos internos en orden, para finalizar con el residuo C-terminal. Además, se ha empleado la nomenclatura inglesa para indicar el número de aminoácidos que contiene la cadena peptídica, empleando la abreviatura *mer*.

NOTA SOBRE PUNTUACIÓN

Con el fin de simplificar la publicación de los resultados en revistas internacionales que requieren uso de puntuación en la numeración inglesa, se ha utilizado este sistema en la parte experimental de la Memoria de esta Tesis Doctoral. Así, las cifras decimales se indican con puntos en lugar de con comas, aceptado por la Real Academia Española de la Lengua en el Diccionario Panhispánico de Dudas desde su primera edición en octubre de 2005 (<http://buscon.rae.es/dpdI>).

L-AMINOÁCIDOS Y NOMENCLATURA UTILIZADA EN RMN



ABREVIATURAS EMPLEADAS

En esta Memoria se han empleado los acrónimos y abreviaturas recomendados en Guidelines for Authors (*J. Org. Chem.* **2008**, 73). Algunas abreviaturas menos frecuentes se indican a continuación:

Generales

CCTLC	Cromatografía circular centrífuga en capa fina
mCPBA	Ácido <i>m</i> -cloroperbenzoico
CPPs	<i>Cell penetrating peptides</i>
DC	Dicroísmo circular
DM	Dinámica molecular
dNTP	Desoxitrinucleósido trifosfato
DTNB	Ácido ditionitrobenzoico
FAD	Flavín adenina dinucleótido
GR	Glutation reductasa
HDMD2	<i>Human double minute 2</i>
HPLC	High performance liquid chromatography
HTS	<i>High-throughput screening</i>
LC	Leishmaniasis cutánea
Li-TryR	Tripanotión reductasa de <i>Leishmania infantum</i>
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
LV	Leishmaniasis visceral
MDM2	<i>Murine double minute 2</i>
NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reducida
OMS	Organización Mundial de la Salud
IPPs	Interacciones proteína-proteína
PS	Poliestireno
RCM	<i>Ring-closing metathesis</i>
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SPPS	<i>Solid Phase peptide synthesis</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TFA	Ácido trifluoroacético
TI	Transcriptasa inversa
TIPS	Triisopropilsilano
TNB	Ácido tionitrobenzoico
T(SH)₂	Tripanotión reducido
TryR	Tripanotión reductasa
TS₂	Tripanotión oxidado
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VS	<i>Virtual screening</i>

Aminoácidos no naturales, grupos protectores y agentes de acoplamiento

Al, alil	Alilo
Alloc	Aliloxicarbonilo
Boc	<i>tert</i> -Butoxicarbonilo
Cbz	Carbobenciloxi
DIC	Diisopropilcarbodiimida
HATU	Hexafluorofosfato de <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HBTU	Hexafluorofosfato de <i>O</i> -(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HCTU	Hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HOAt	1-Hidroxi-7-azabenzotriazol
Mmt	Monometoxitritilo
Nle	Norleucina
OAl	Aliloxi
Phipr	Fenilisopropilo
PyAOP	Hexafluorofosfato de [(7-azabenzotriazol-1-il)oxi]tris(pirrolidino)fosfonio
PyBOP	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitri(prrolidino)fosfonio
^tBu	<i>tert</i> -butilo
Trt	Tritilo

Reactivos y disolventes

DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DCM	Diclorometano
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DIEA	Diisopropiletilamina
MBHA	4-metilbencihidrilamina
NMP	<i>N</i> -metil-2pirrolidona
TEA	Trietilamina
TFE	Trifluoroetanol
THF	Tetrahidrofurano
TNB	Ácido 2-nitro-5-mercaptobenzoico

SUMMARY

FROM PEPTIDES TO PEPTIDOMIMETICS IN THE SEARCH OF NOVEL INHIBITORS OF TRYPANOTHIONE REDUCTASE OF *LEISHMANIA INFANTUM* (Li-TryR)

Introduction

Leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by *Leishmania* parasite. Although leishmaniasis is emerging nowadays as a worldwide disease, only a limited and outdated drug arsenal for the treatment of leishmaniasis is available. Therefore, there is an urgent need to find new targets and/or inhibition mechanisms for the discovery of inhibitors against these parasite infections.

Trypanothione Reductase (TryR) is a validated and an attractive target in the search for new drugs for the treatment of leishmaniasis. This enzyme is exclusive (it does not exist in mammals) and is essential for parasites survival. Since, the biologically functional form of TryR is a homodimer, we have recently reported an alternative inhibition strategy that attempts to disrupt the dimer interface of the homodimer by designing protein-protein interaction inhibitors. By using the recently reported X-ray crystal structure of *Leishmania infantum* TryR (Li-TryR) and site-directed mutagenesis we have identified and validated residues E436 and Q439 as "hot spots" for dimer stabilization. These residues are located in an α -helix spanning from P435 to M447 (Figure 1).

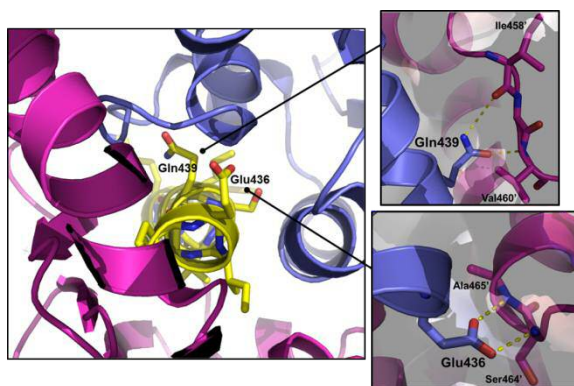


Figure 1

From the design and test of a small library of linear peptides derived from this interfacial α -helix, the 13-mer linear peptide **P2** (Ac-PKIIQSVGISMKM-NH₂) significantly inhibits, both the oxidoreductase activity and the dimerization of the enzyme, thus emerging as a promising TryR dimerization inhibitor.

Objectives

In the present Thesis, the author focuses on the design and synthesis of peptides and peptidomimetics derived from the hot spots named above, in order to inhibit monomer-monomer interactions of the dimeric enzyme as a novel therapeutic approach and intend to optimize the activity and pharmacokinetic properties of the linear peptide prototype **P2**.

In Chapter 1, in order to improve the chemical stability of **P2** we synthesized the peptide **1.01**, bearing two Nle instead of Met. Moreover, to determine the minimal length required for activity a series of truncated peptides at the C-terminal end were prepared (Series 1). With the aim of improving the activity proteolytic stability of the linear prototype, side chain-to-side chain cyclized peptides, to stabilize the α -helical conformation into shapes resistant to proteases, were investigated (Series 2). To determine the optimal position of the covalent linkage, a first series of cyclic peptides with amide bridges between side-chains at different i and $i+4$ positions (at the non-interacting face of the enzyme) were synthesized and evaluated. Hydrocarbon-stapled peptides bearing the staple at the optimal cyclization positions were also prepared that could also gain the ability to penetrate cells. Furthermore, several foldamers (Series 3), less susceptible to proteolytic degradation, following systematic $\alpha \rightarrow \beta^3$ replacements with different patterns were synthesized and evaluated.

Additionally, structural studies by circular dichroism (CD) and molecular dynamics (MD) simulations of the cyclic peptides were performed. Proteolytic stability studies of the most active peptides and peptidomimetics using proteinase K, a protease with a broad substrate profile, were also carried out.

In Chapter 2, the most representative peptides and peptidomimetics obtained in chapter 1 were evaluated against *Leishmania infantum* parasites *in vitro*. To improve the cellular permeability of these compounds, we designed conjugates of peptides and peptidomimetics with cell-penetrating peptides (CPPs), which had been previously shown to be powerful transport vector tools for the intracellular delivery. Internalization studies with fluorescent analogues of peptides and CPPs-peptide conjugates by confocal microscopy were also performed.

To avoid the peptidic character of the peptide prototypes, in Chapter 3 we synthesized non-peptide peptidomimetics based on two different strategies. On the one hand, we prepared pyrrolopyrimidines (a type of proteomimetics), a well-known scaffold described in the literature to mimic the α -helical conformation in which we introduced

the side-chains of *i*, *i*+3 and *i*+7 residues that are relevant for peptide-TryR interaction. On the other hand, we carried out a pharmacophore-based virtual screening using *IQM* and *NCI* libraries.

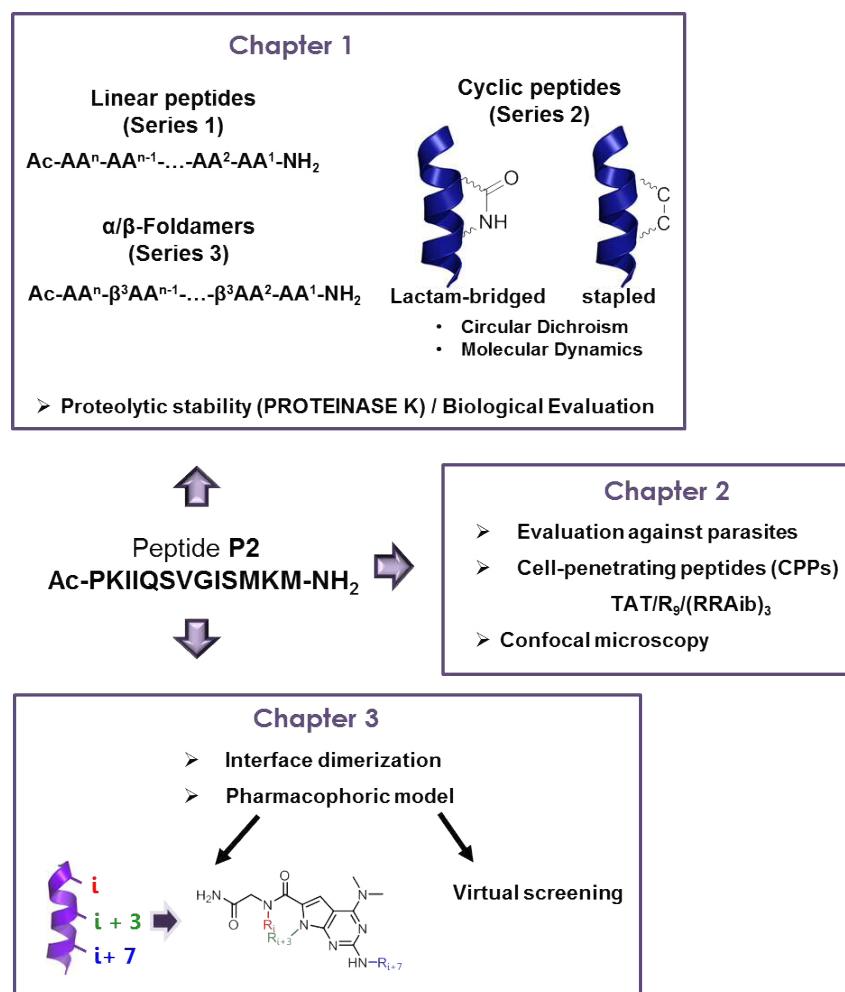


Figure 2

Results

The main results for Chapter 1 can be summarized as follows:

- Linear truncated peptides at the C-terminal end (**1.01-1.06**) were synthesized using a SPPS strategy. The chemically stable peptide **1.01**, maintained the inhibition potency of the **P2** prototype against *Li*-TryR in both activity and dimerization assays. Peptide **1.05** (9-mer) represents the minimal length required for activity.
- To explore the best position for cyclization in 9-mer and 13-mer peptides, a series of lactam-bridged peptides at different *i*, *i*+4 positions (**1.09-1.14**) were synthesized following an on-resin cyclization approach. Cyclization between positions 3/7 and 4/8 in 13-mer peptides gave the best results in both, activity and dimerization

assays. Next, these optimal cyclization positions and peptide length were selected for the synthesis of hydrocarbon stapled peptides (**1.37**, **1.41**) using an on-resin ring-closing metathesis strategy. CD structural studies showed a higher helical content in solution for lactam-bridged peptides when compared to the corresponding stapled peptides. MD simulations allowed us to rationalize these results.

- The nature of the bridge in the cyclic peptides (amide vs C-C) does not significantly affect the inhibition of enzyme activity and both type of cyclic peptides (**1.09**, **1.10** vs **1.37b**, **1.41b**) showed similar IC₅₀ values in the low micromolar range. However, their results in the TryR dimerization assay are strikingly different. The lactam-bridged analogues have proven to be potent dimerization inhibitors (similar to the linear prototype) while the stapled peptides **1.37b** and **1.41b** behaved as enhancers of the dimerization process.

- A small library of foldamers was also prepared using $\alpha\beta\alpha\alpha\beta$ and $\alpha\alpha\beta$ substitution patterns (α/β -peptides). Most of them showed potent IC₅₀ values (in the low micromolar range) in both, activity and dimerization assays.

- Proteolytic stability studies in the presence of proteinase K showed that lactam-bridged and stapled peptides (**1.09**, **1.10** and **1.37b**, **1.41b**) were from 2 to 18-fold more stable than linear peptide **1.01**. The half-life time of the α,β -peptides depends on the position of the β^3 residue. Some of these compounds were 10- to 20-fold more resistant to proteolysis than the parent **1.01**.

The main results for Chapter 2 can be summarized as follows:

- The most significant peptides and peptidomimetics described in chapter 1 were evaluated against *Leishmania infantum* parasites and THP-1 cells *in vitro*, to determine their leishmanicidal activity and cytotoxicity. These compounds resulted inactive, probably due to poor cell permeability. The cellular permeability was improved by using cell-penetrating peptides (polyarginines, TAT and (RR-Aib)₃). The corresponding CPPs-peptide conjugates have shown potent leishmanicidal activity against both promastigotes and amastigotes (in the low micromolar range), similar to those of the reference drugs edelfosine and miltefosine. The conjugate **2.10** of foldamer **1.48** with polyarginines is the most active compound of the series (in the sub-micromolar range). Conjugate **1.48** also proved to be the least cytotoxic compound of the series, thereby with a selectivity index similar or even superior to that of miltefosine and edelfosine.

- The internalization of fluorescently-labeled peptides and CPPs-peptides conjugates into the parasites and macrophages was visualized by confocal microscopy.

The main results for Chapter 3 can be summarized as follows:

- The synthesis of structural helix mimetics, based on the pyrrolopyrimidine scaffold, has been performed by a combined solution and solid-phase approach.
- Docking studies of pyrrolopyrimidine **3.01** with the monomer of *Li*-TryR (Figure 3) show that the hydrophobic pocket where the *sec*-butyl substituent at position 2 may allocate bigger substituents. Moreover, this group is at a distance of approximately 6 Å from Phe454. To optimize interactions of these compounds with this hydrophobic pocket, a series of pyrrolopyrimidines differently substituted at the position 2, were synthesized and evaluated. Pyrrolopyrimidine **3.38**, bearing a benzyl group at this position, was a potent inhibitor of the dimerization process, with IC₅₀ values similar to that of prototype **P2** and linear peptide **1.01**.

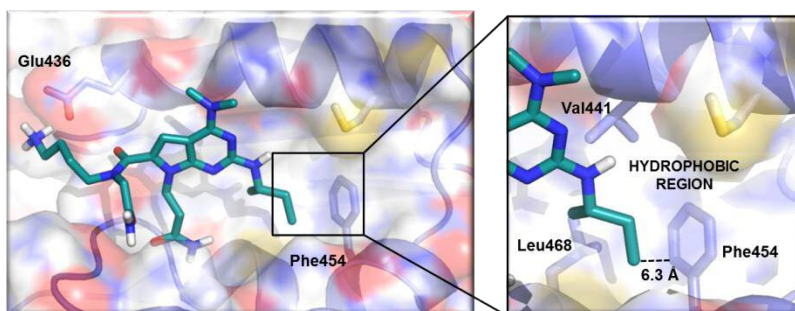


Figure 3

- From a pharmacophore-based virtual screening using the *IQM* and *NCI* libraries, several small molecule hits were identified and evaluated. Some of these compounds (**3.45-3.47**) showed moderate IC₅₀ values in the TryR oxidoreductase assay in the micromolar range and behave as enhancers of the dimerization process of the enzyme.

Conclusions

In this Thesis we designed, synthesized and evaluated peptides and a variety of peptidomimetics in the search of new drugs for leishmaniasis treatment.

In Chapter 1, we obtained several linear peptides, cyclic peptides and α,β -peptides that significantly inhibited, both, the oxidoreductase activity and the dimerization of the *Li*-TryR with values similar to those of the peptide prototype. Hydrocarbon stapled peptides **1.37b** and **1.41b** behave as enhancers of the dimerization process. Stapled

peptides and several foldamers showed substantially improved the proteolytic stability against proteinase K in comparison with linear peptides.

In Chapter 2, we obtained active peptides and peptidomimetics in *in vitro* assays against parasites by conjugation with cell-penetrating peptides. Conjugated **2.10** of foldamer **1.48** with polyarginines resulted in the most potent and selective compound of this series.

In Chapter 3, we described the first inhibitors (**3.38**) and stabilizers (**3.45-3.47**) of the dimerization process of the *Li*-TryR of non-peptide nature, that deserve further modifications in order to improve their inhibition of the activity against the enzyme and evaluate their leishmanicidal activity.

INTRODUCCIÓN



I.1. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria causada por un protozoo del género *Leishmania* y transmitida por la picadura de dípteros de los géneros *Lutzomyia* y *Phlebotomus*. A pesar de haber sido descrita por primera vez en 1903 por Leishman y Donovan¹, hoy en día sigue siendo un problema de salud pública en más de 88 países, donde hasta 350 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que hay 12 millones de infectados, y unos 2 millones de nuevos casos de infección al año entre niños y adultos.²

La leishmaniasis estuvo limitada históricamente a los países cercanos al trópico, pero en los últimos años esta enfermedad se considera una zoonosis emergente en el mundo desarrollado, como es el caso de los EE UU^{3,4}, y ha surgido como infección oportunista ligada a enfermedades crónicas de tipo viral como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Según datos de la OMS, la co-infección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH, agente etiológico del SIDA) se está convirtiendo en una siniestra tendencia global² (Figura I.1). En personas infectadas por VIH, la leishmaniasis acelera la aparición del SIDA por una inmunosupresión acumulativa, estimulando la replicación del virus.

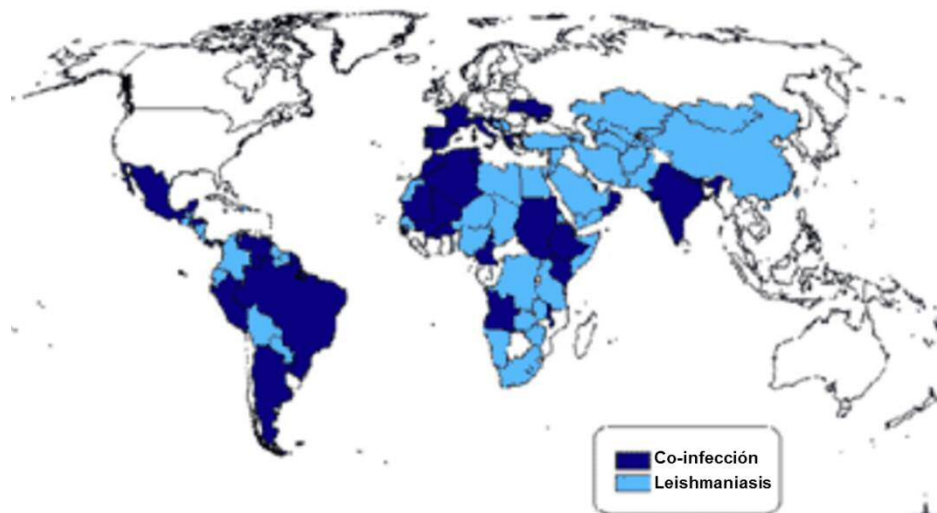


Figura I.1. Países afectados por la leishmaniasis y países en los que se presenta la co-infección de esta enfermedad con el VIH.

Desde un punto de vista epidemiológico, existen tres variantes de esta enfermedad: la leishmaniasis cutánea y cutánea difusa (LC y LCD), la leishmaniasis

INTRODUCCIÓN

mucocutánea (LMC) y la leishmaniasis visceral (LV), la cual puede resultar letal si no se trata, ya que afecta a órganos vitales como el hígado y el bazo. Todas estas variantes de la enfermedad comparten tres rasgos patogénicos comunes: (1) los macrófagos del organismo hospedador son la diana y el soporte intracelular para la replicación del parásito, (2) la respuesta inmunoinflamatoria del hospedador regula la expresión y propagación de la enfermedad, y (3) siempre se trata de una infección persistente en los tejidos.⁵

I.1.1. Ciclo vital de *Leishmania*

Leishmania presenta un ciclo de vida complejo con dos etapas principales: una etapa extracelular dentro de un huésped invertebrado (flebotomo) donde presenta una morfología promastigote y una intracelular dentro del huésped vertebrado con una morfología amastigote.^{6,7}

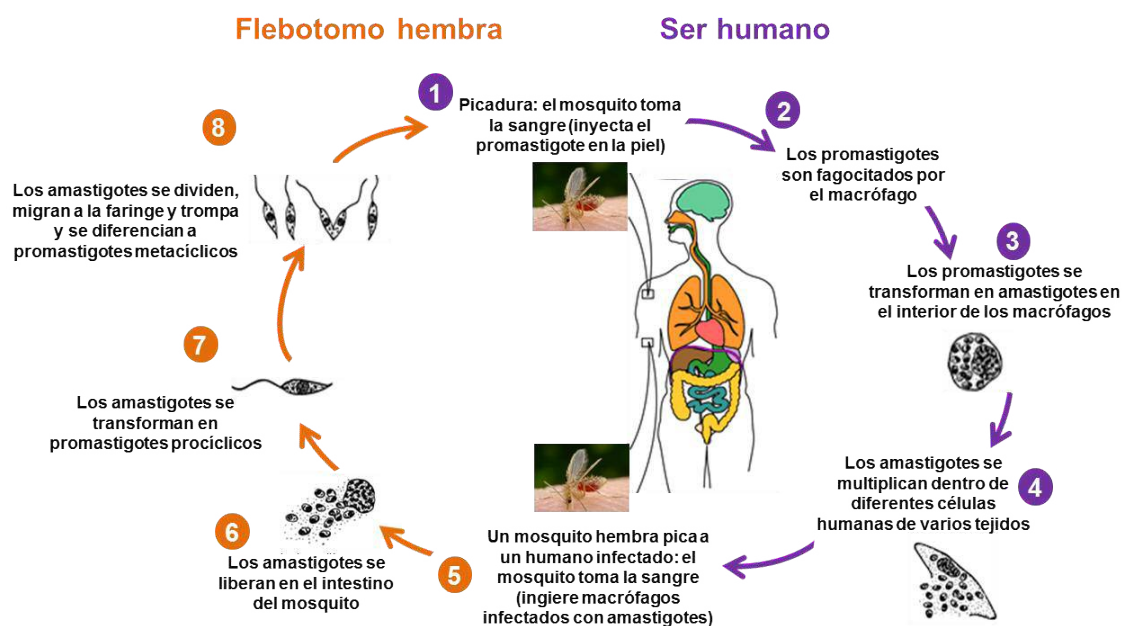


Figura I.2. Ciclo vital de *Leishmania* (figura adaptada de la referencia⁸).

El ciclo vital comienza cuando una hembra de flebotomo portadora pica a un huésped vertebrado (Figura I.2). Una vez que los promastigotes entran en el flujo sanguíneo humano (etapa 1) se desencadena la respuesta inmune primaria, siendo fagocitados los parásitos por neutrófilos y macrófagos (etapa 2). Dentro de estas células inmunitarias, los promastigotes se transforman en amastigotes (etapa 3). Por último, tras la lisis de las células fagocíticas infectadas, se liberan al flujo sanguíneo

los protozoos, infectando nuevas células inmunes (etapa 4). A continuación, si un mosquito hembra pica a un humano infectado, éste ingiere macrófagos infectados con amastigotes (etapa 5). Los amastigotes se liberan en el intestino del mosquito (etapa 6) y se transforman en promastigotes (etapas 7 y 8), los cuales presentan una morfología alargada y motilidad propia gracias a la presencia de un flagelo. Las especies del parásito y el sistema inmune del organismo huésped determinan el estadio clínico de la enfermedad.

I.1.2. Tratamiento de la leishmaniasis en la actualidad

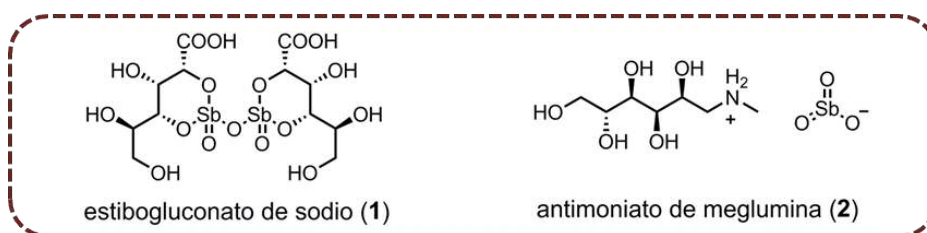
En la actualidad no existen vacunas efectivas para prevenir la leishmaniasis⁹ y el arsenal farmacológico del que se dispone en el tratamiento de esta enfermedad es muy limitado. Entre ellos cabe destacar los antimoniales pentavalentes (Sb^{V}) (por ejemplo **1** y **2**), la pentamidina (**3**), la anfotericina B deoxicolato (**4**), la miltefosina (**5**) y la paromomicina (**6**) (Figura I.3).^{10,11}

Desde su descubrimiento en 1945, los antimoniales pentavalentes¹² constituyen la primera generación de fármacos empleados en el tratamiento de esta enfermedad. Dentro de esta familia se encuentran el estibogluconato de sodio (**1**) y el antimonio de meglumina (**2**). Aunque durante los 60 años de utilización de estos fármacos no se ha elucidado su mecanismo de acción, se sabe que son profármacos, que requieren de su reducción a la forma trivalente (Sb^{III}) para activarse.

La segunda generación de fármacos la constituyen la pentamidina¹³ (**3**) y el antibiótico anfotericina B¹⁴ (**4**), los cuales se han empleado desde la segunda mitad del siglo pasado en aquellos casos en los que los antimoniales pentavalentes no resultaban efectivos.

Sin embargo, aunque muchos de estos fármacos se conocen desde hace más de medio siglo, se han realizado muy pocos progresos en los últimos tiempos. Además, precisan tratamientos prolongados y deben ser suministrados por vía parenteral, lo que supone un alto coste. Junto a la aparición de nuevas cepas resistentes a estos fármacos también se han descrito problemas de toxicidad. Así, en el caso de los derivados de antimonio se han observado problemas de toxicidad cardíaca, llegando a morir hasta el 6% de los pacientes a causa del tratamiento.

Fármacos de primera generación (antimoniales pentavalentes)



Fármacos de segunda generación

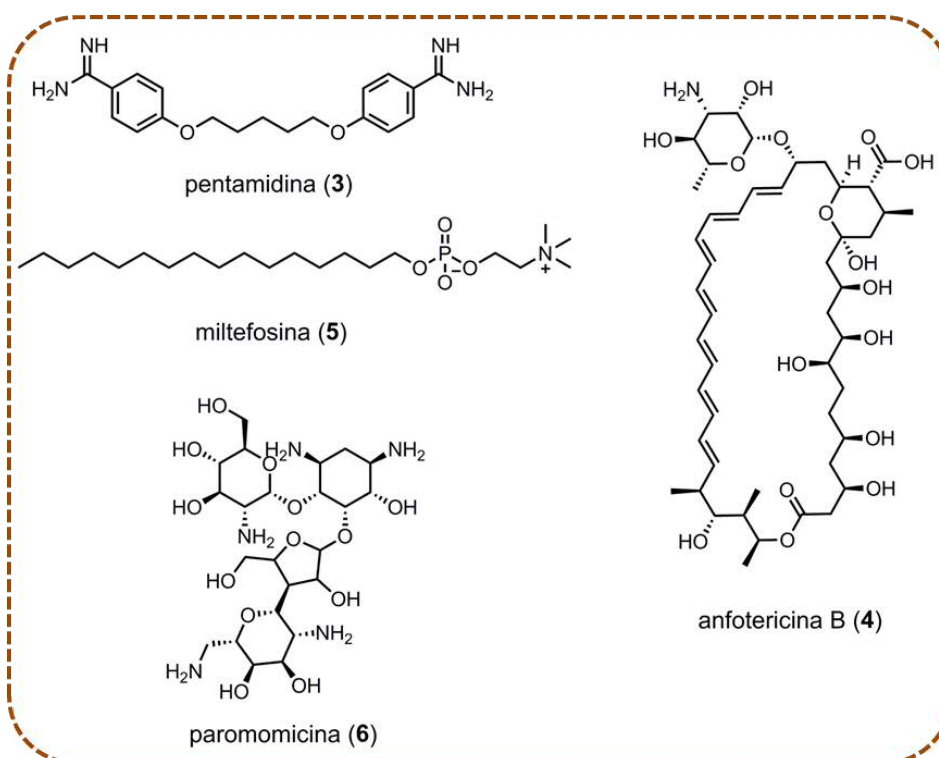


Figura I.3. Fármacos aprobados para el tratamiento de la leishmaniasis.

El último fármaco aprobado para el tratamiento de la leishmaniasis es la miltefosina^{15,16} (5), un fármaco inicialmente desarrollado como anticanceroso y que fue registrado en India en 2002 para el tratamiento de la leishmaniasis visceral. Este fármaco ha supuesto un gran avance, ya que se trata del primero que puede ser suministrado de forma oral. Sin embargo, presenta altos costes de producción y efectos teratogénicos. Al igual que en el caso de los otros fármacos, ya se han descrito cepas resistentes a este fármaco por algunos laboratorios.

Por último, cabe destacar la paromomicina (6), un antibiótico aminoglicosilado de amplio espectro, que puede ser utilizado tanto para el tratamiento de la LV como de la LC. No obstante, la baja absorción oral que presenta este fármaco ha hecho que se administre por vía parenteral y tópica para tratar la LV y la LC, respectivamente¹⁷.

La terapia combinada de los fármacos disponibles y descritos anteriormente, está permitiendo retrasar el desarrollo de resistencias, aumentar la actividad antiparasitaria, disminuir la dosis y duración del tratamiento. Aun así, es necesaria la búsqueda de nuevas aproximaciones en el tratamiento de esta enfermedad.

I.1.3. Diferencias en el metabolismo redox de los protozoos y de los mamíferos

Se han descrito diferencias entre el metabolismo redox de los protozoos y el de los mamíferos.^{18,19} Así, en el caso de los protozoos, dicho metabolismo redox se regula mediante el sistema Tripanotión Reductasa (TryR)/Tripanotión (N_1, N_8 (glutathionil)espermidina), mientras que en el caso de los mamíferos está regulado por el sistema Glutathión Reductasa/Glutathión. El tripanotión se forma por la condensación de dos moléculas de glutatión (péptido) y una de espermidina (poliamina) (Figura I.4).

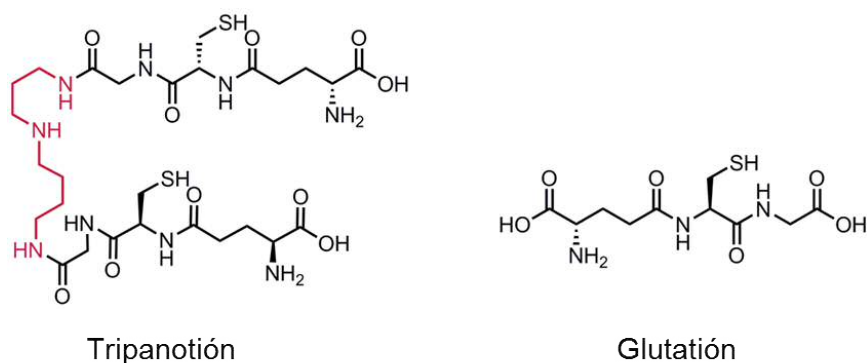


Figura I.4. Estructuras del tripanotión y glutatión, sustratos de las enzimas TryR y GR, respectivamente. La molécula de espermidina aparece marcada en color rojo.

Dentro de las proteínas secuenciadas del protozoo, la TryR es una flavoproteína que utiliza el flavín adenín dinucleótido (FAD) como cofactor y el NADPH como donador de electrones (Figura I.5). La TryR está altamente relacionada en su estructura con la glutathión reductasa (GR) humana y presenta un 30% de homología de secuencia. Sin embargo, la TryR y la GR difieren en su especificidad de sustrato²⁰. La TryR reduce exclusivamente el tripanotión TS₂ (molécula con carga neta positiva), pero no el glutatión^{20,21} (molécula con carga neta negativa). Asimismo, la GR no reconoce el tripanotión como sustrato y reduce selectivamente el glutatión. Este hecho podría explicarse en base a las diferencias de densidad electrónica que existen en el sitio activo de las dos enzimas.

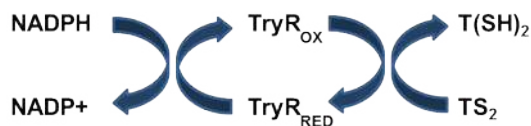


Figura I.5. Sistema TryR-Tripanotión, esencial y exclusivo para la supervivencia del protozoo. En la figura se representa la cascada de electrones desde el NADPH hasta el tripanotión reducido. TS₂ = tripanotión oxidado. T(SH)₂ = tripanotión reducido.

I.1.4. Estructura de la Tripanotión reductasa de *Leishmania infantum* (Li-TryR)

En 1987 se caracterizó la estructura cristalina de la TryR de *T. cruzi*²² y más recientemente se han determinado las estructuras cristalinas de la TryR de otras especies. Así, en el año 2009 se determinó la estructura cristalina de la TryR de *Leishmania infantum*²³, enzima objeto de estudio de la presente tesis doctoral.

La estructura de la TryR de *Leishmania infantum* es un homodímero de 53 KDa. Cada uno de los monómeros está formado por dos subunidades distintas: una de unión a FAD y otra de unión a NADPH. Ambos monómeros se encuentran conectados por la interfaz de dimerización, objeto de estudio de esta Tesis doctoral (Figura I.6).

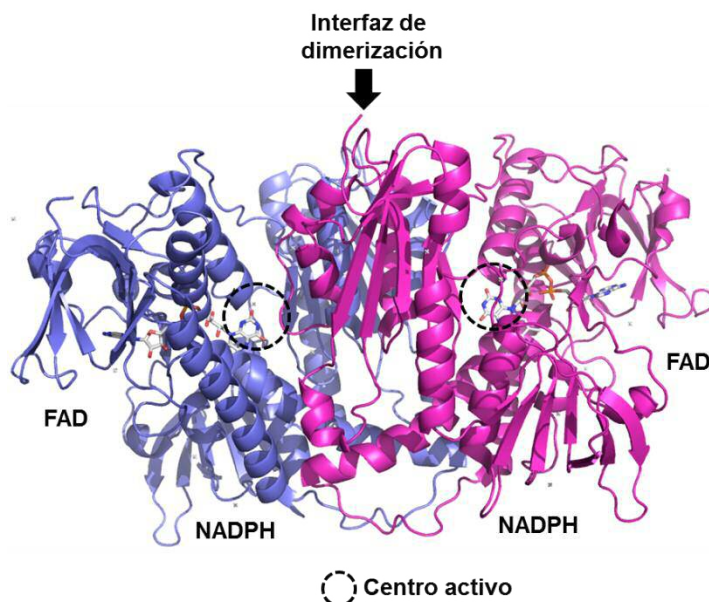


Figura I.6. Estructura cuaternaria de la Tripanotión reductasa de *Leishmania infantum* en complejo con FAD (código PDB: 2jk6).

El centro activo de la TryR está formado por dos residuos de cisteína (Cys52 y Cys57), los cuales, en su forma oxidada, se encuentran formando un enlace disulfuro (Figura I.7).

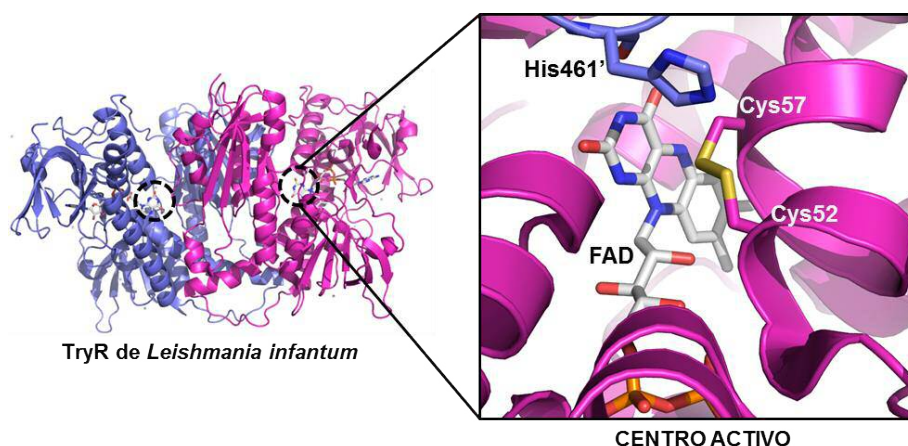


Figura I.7. Centro activo de la TryR donde se encuentran la Cys52 y la Cys57 formando un enlace disulfuro en su forma oxidada.

Según el modelo catalítico propuesto para la enzima análoga de *Plasmodium falciparum*²⁴, cuando una unidad de cistina (Cys52-Cys57) del sitio activo se reduce por un equivalente de reducción proveniente del NADPH, mediante ataque nucleofílico del azufre de la Cys57 sobre el anillo de flavina del FAD, se forma un complejo estable de transferencia de carga entre el FAD y la Cys57. A continuación, tras disociarse la molécula oxidada de NADP⁺ y la entrada de una nueva molécula de NADPH, el tiol de la Cys52, el cual se encuentra activado por el par His461' y Glu466', ataca al átomo de azufre del T(S)₂, formándose un disulfuro mixto enzima-sustrato (Figura I.8). Por último, el ataque nucleófilo de la Cys57 sobre la Cys52 regenera el enlace disulfuro del centro activo, liberando una molécula de T(SH)₂.

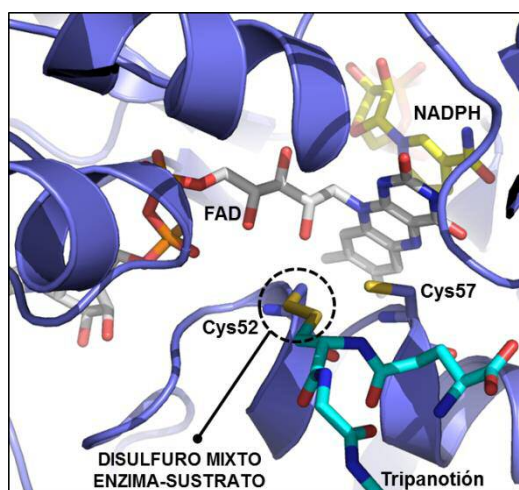


Figura I.8. Formación del enlace disulfuro mixto enzima-sustrato generado durante el mecanismo catalítico propuesto. La molécula de tripanotión se representa en azul y los cofactores FAD y NADPH en gris y amarillo, respectivamente.

I.1.5. Inhibidores de la Tripanotión reductasa (TryR)

El papel clave que desempeña la TryR en la supervivencia de los tripanosomátidos y en su capacidad infectiva, así como, la ausencia de la misma en el sistema Tripanotión/TryR en mamíferos, ha convertido a dicha enzima en una diana terapéutica validada y muy atractiva para el diseño de inhibidores en los últimos años.²⁵

Hasta la fecha se han descrito diversos inhibidores de la TryR que actúan en el centro activo de la enzima. Muchos de ellos son compuestos tricíclicos²⁶ y, como tendencia general, se puede apreciar un carácter lipófilo y la presencia de al menos una amina en su estructura. No obstante, el gran tamaño que presenta el centro activo de la enzima, así como su distribución de cargas y su estructura abierta dificulta en gran medida el diseño racional basado en la estructura de la misma. A pesar de que en los últimos años se han descrito numerosas moléculas que presentan actividad moderada frente a la TryR, hoy en día todavía no se conoce cuál es su mecanismo de acción, a excepción únicamente de dos estructuras: la mepacrina²⁷ y unos derivados de 3,4-dihidroquinazolina²⁸, los cuáles se han podido co-cristalizar en presencia de la enzima.

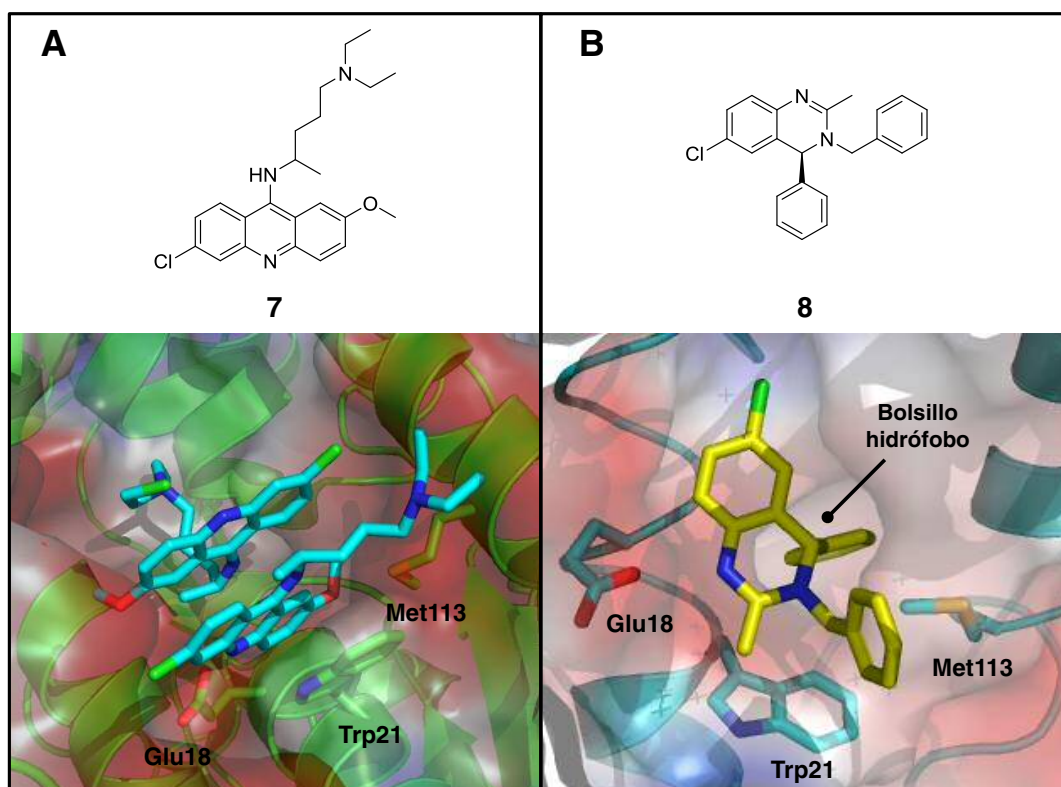


Figura I.9. A) Mepacrina (7) y estructura cristalina de TryR de *T. cruzi* con la mostaza de la mepacrina (Código PDB: 1GXF). B) (4S)-3-bencil-6-cloro-2-metil-4-fenil-3,4-dihidroquinazolina (8) y estructura cristalina de este inhibidor con la TryR de *T. brucei* (Código PDB: 2WP6).

En la Figura I.9 se muestran las estructuras de la mepacrina (**7**) y del (4*S*)-3-bencil-6-cloro-2-metil-4-fenil-3,4-dihidroquinazolina, uno de los derivados de 3,4-dihidroquinazolina (**8**), así como el detalle de los complejos co-cristalizados comentados anteriormente.

La mepacrina (**7**) fue el primer compuesto tricíclico identificado como un inhibidor competitivo y selectivo de la TryR, ya que no inhibe la GR humana. Como se puede observar en la Figura I.9A, el anillo de acridina de la mepacrina se fija en el sitio activo, en una región hidrofóbica delimitada por los residuos de Trp21 y Met113. Además, la mepacrina interacciona con la cadena lateral del Glu18 a través de su alquilamino. En la estructura cristalizada de TryR de *T. cruzi* con la mostaza de la mepacrina, se unen dos moléculas de mepacrina en el centro activo de la enzima. Así, se puede apreciar el gran tamaño que presenta el centro activo de la TryR.

En el caso de los complejos cristalinos resueltos para las 3,4-dihidroquinazolininas en complejo con la TryR de *T. brucei* (**8** como ejemplo), se observa que sólo en presencia del inhibidor se genera un pequeño bolsillo hidrofóbico, en el mismo sitio donde se unía **7**, para acomodar al grupo arilo presente en **8** (Figura I.9B).

Estos datos experimentales han llevado a proponer dos regiones de interacción de los distintos inhibidores de la TryR que actúan a nivel de centro activo. La primera región sería aquella donde interacciona el anillo tricíclico de la mepacrina (**7**) o los derivados de 3,4-dihidroquinazolina (como **8**), en la que se anclan los residuos cargados positivamente a través del Glu18. La segunda zona, estaría en el entorno de los residuos hidrofóbicos Leu393, Phe396 y Leu399, residuos que dan entrada a la cavidad que queda en la interfaz de dimerización de la TryR. En esta segunda región es donde interaccionan los dos grupos amino del tripanotión (sustrato) con las cadenas laterales del otro monómero Glu465' y Glu466'. Sin embargo, en los distintos programas de búsqueda de nuevos inhibidores y en estudios de relaciones estructura-actividad (SAR) llevados a cabo hasta el momento haciendo uso de esa segunda región, y en los que se ha utilizado este modelo de interacción en el diseño, no se han observado incrementos destacados en la potencia de los fármacos, y lo que es más llamativo, dentro de compuestos de una misma serie química, se observan comportamientos inhibitorios dispares (competitivo, no competitivo y mixto).

Debido a la dificultad en el diseño de inhibidores de la enzima basados en la proteína, más recientemente se han llevado a cabo diferentes programas de cribado de alto rendimiento (HTS) así como de cribados virtuales de quimiotecas diversas

INTRODUCCIÓN

frente a la enzima.²⁹⁻³⁶ Como resultado, se han identificado moléculas con perfiles de inhibición moderados (en el rango sub-micromolar), y que de nuevo presentan mecanismos de inhibición dispares para derivados de una misma serie.

Por tanto, a pesar de haberse descrito varios inhibidores análogos de sustrato con valores de inhibición *in vitro* (CI₅₀) del orden μM e incluso nM, no se han conseguido resultados *in vivo* satisfactorios. En este trabajo se pretende explorar una nueva estrategia de inhibición de la TryR que permita el desarrollo de nuevos inhibidores más efectivos, que actúen por un mecanismo de acción novedoso y diferente a los explorados hasta el momento.

ANTECEDENTES

I.2. ANTECEDENTES

I.2.1. Inhibición del proceso de dimerización de la *Li*-TryR

Basándonos en el hecho de que la enzima deba constituirse en su forma homodimérica para ser activa, en nuestro grupo de investigación se ha iniciado una novedosa estrategia de inhibición que consiste en la búsqueda de inhibidores de interacciones proteína-proteína entre ambas subunidades en la interfaz de dimerización de la TryR de *L. infantum*.

Está generalmente admitido que en una interacción proteína-proteína la energía de unión no se encuentra distribuida por igual a lo largo de la interfaz de dimerización³⁷, sino que se localiza en un número pequeño de residuos que ejercen un papel crucial en la estabilización de dicha interacción proteína-proteína y que se consideran como *hot spots* de unión.³⁸ Dichos *hot spots* se localizan en regiones enterradas de la interfaz de dimerización y favorecen tanto interacciones de tipo puente de hidrógeno como interacciones de tipo hidrófobo. Por ello, la posible modulación de interacciones proteína-proteína por moléculas pequeñas que interaccionen en dichos *hot spots* constituye hoy en día una línea de investigación novedosa y alternativa en la búsqueda de nuevos fármacos, ya que permitiría acceder a compuestos más selectivos y eficaces.

Con el fin de localizar los *hot spots* en la interfaz de dimerización de la TryR de *L. infantum*, el grupo del Dr. Federico Gago (Universidad de Alcalá), tras construir por homología un modelo para la enzima basado en la estructura de *C. fasciculata* (1FEC)³⁹, determinó la contribución energética (electrostática y de Van der Waals), así como la superficie accesible al disolvente⁴⁰ de cada uno de los residuos de la interfaz de dimerización. De todos los residuos, sólo tres mostraron una mayor contribución a la energía de dimerización de la TryR: Trp81, Glu436 y Gln439.

Así, el Trp81 se encuentra enterrado en un bolsillo hidrofóbico, definido por los residuos de Tyr69', Met70', Ile73', Leu88', Pro90', Gly209' y Tyr210' del otro monómero y que forma parte del dominio de unión a FAD (Figura I.10).

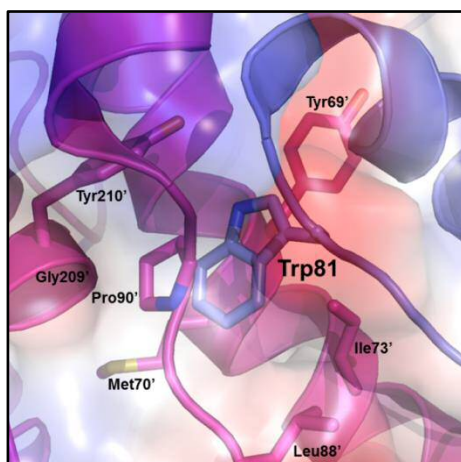


Figura I.10. Residuo de Trp81 como potencial *hot spot*, rodeado por los residuos de Tyr69', Met70', Ile73', Leu88', Pro90', Gly209' y Tyr210' del otro monómero (magenta).

Por otro lado, los residuos de Glu436 y Gln439 se encuentran situados en una hélice α (de secuencia Pro435-Met447), situada en la interfaz de dimerización. El residuo de Glu436 establece interacciones de tipo electrostático con el esqueleto peptídico de la Ser464' y Ala465' (del otro monómero), mientras que el residuo de Gln439 lo hace con el esqueleto peptídico de los residuos de Ile458' y Val460' (Figura I.11).

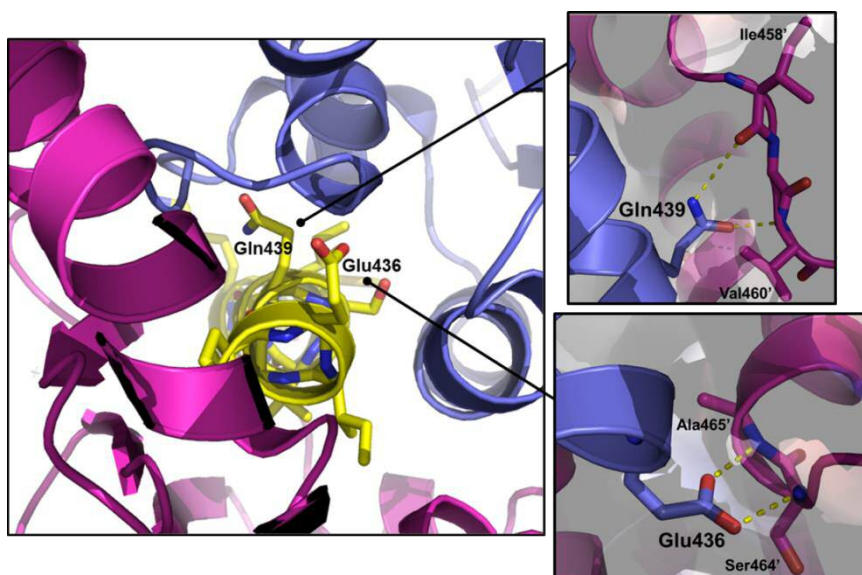


Figura I.11. Hélice α (de secuencia Pro435-Met447) de color amarillo y potenciales *hot spots* Glu436 y Gln439 que establecen interacciones con los residuos del otro monómero de Ser464' y Ala465', y de Ile458' y Val460', respectivamente.

A continuación, se evaluó la contribución experimental de estos tres residuos en la actividad catalítica de la enzima, en el proceso de oligomerización o en la unión de FAD mediante la expresión de los mutantes Trp81Ala, Glu436Ala y Gln439Ala, entre otros. En base a los resultados obtenidos de la mutagénesis dirigida, se propusieron el Glu436 y la Gln439 como residuos claves (*hot spots*) en la dimerización de TryR y en la actividad catalítica de la enzima.

Una vez determinada la importancia de estos *hot spots* (Glu436 y Gln439) en la dimerización de la enzima, en nuestro grupo de investigación llevamos a cabo el diseño y síntesis de una pequeña quimioteca de péptidos lineales derivados de la mencionada hélice α^{41} (Pro435-Met447).

De esta manera, se diseñó el péptido **P1**⁴¹ (Ac-Pro-Glu-Ile-Ile-Gln-Ser-Val-Gly-Ile-Ser-Met-Lys-Met-NH₂), en el que se sustituyó la Cys de la posición 10 de la hélice α (residuo 444 en la enzima) por una Ser con el fin de evitar potenciales problemas de oxidación. Además, se protegieron los extremos *N*-terminal como acetilo y *C*-terminal como carboxamida para aumentar la estabilidad del péptido frente a proteasas.

Este péptido fue evaluado en un novedoso ensayo de dimerización, desarrollado por el laboratorio del Prof. Antonio Jiménez (Universidad de Alcalá), basado en la detección de la especie dimérica en presencia de potenciales efectores de la dimerización de la TryR (este ensayo se describirá con más detalle en el apartado de evaluación biológica de esta Tesis). El resultado del ensayo de dimerización permitió determinar que el péptido **P1** era capaz de inhibir la dimerización de la enzima en el rango micromolar ($CI_{50} = 41.6 \pm 4.0 \mu M$).

Posteriormente, se diseñó una pequeña quimioteca de péptidos lineales en los que se realizaron modificaciones en algunos de los residuos de la cadena peptídica. Así, al sustituir el Glu2 (**P1**) por un residuo de Lys, se obtuvo el péptido lineal **P2**⁴¹ (Ac-Pro-Lys-Ile-Ile-Gln-Ser-Val-Gly-Ile-Ser-Met-Lys-Met-NH₂), el cual resultó ser un potente inhibidor, mucho mejor que **P1**, tanto de la actividad de la enzima ($CI_{50} = 1.84 \pm 0.28 \mu M$) como de la dimerización de la *Li*-TryR ($CI_{50} = 17.88 \pm 0.55 \mu M$). En la Figura I.12 se recogen los resultados de la simulación de modelado molecular en la que se muestra la interacción de la Lys2 del péptido **P2** (gris) con los residuos de Glu436 y Asp432 de la proteína (verde).

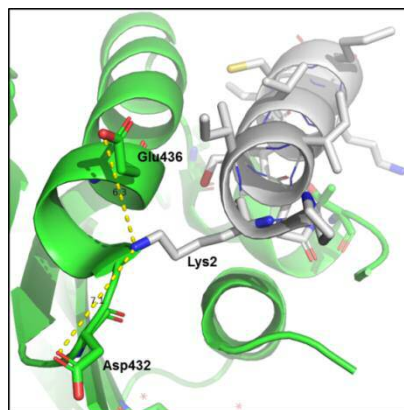


Figura I.12. Detalle de la interacción de la Lys2 del péptido **P2** con los residuos de Glu436 y Asp432 de la proteína.

Los resultados obtenidos en los ensayos enzimáticos para estos péptidos nos han permitido validar la prueba de concepto de esta nueva estrategia de inhibición de la TryR de *L. infantum*. Sin embargo, estos compuestos no presentaron actividad leishmanicida en los ensayos *in vitro* frente a los parásitos. Una de las razones podría ser debida a que estas estructuras peptídicas presenten problemas de biodisponibilidad, y con el fin de mejorar sus propiedades, se debería reducir el carácter peptídico de las mismas. Por esta razón, el objetivo de esta Tesis Doctoral va a ser la optimización del péptido **P2** mediante la búsqueda de peptidomiméticos con el fin de mejorar sus propiedades farmacocinéticas.

I.2.2. Peptidomiméticos en la búsqueda de inhibidores de interacciones proteína-proteína

Los péptidos representan un punto de partida muy atractivo y utilizado en la búsqueda de inhibidores de interacciones proteína-proteína (IPPs). El uso de los péptidos como potenciales agentes terapéuticos presenta algunas ventajas como son una potente actividad *in vitro*, una alta especificidad y una baja toxicidad. Sin embargo, los péptidos presentan perfiles farmacocinéticos desfavorables para su uso como fármacos; que incluyen, entre otros, una baja estabilidad proteolítica, una limitada permeabilidad a través de las membranas celulares, una baja biodisponibilidad oral y una excreción rápida. Por estas razones, un campo de investigación muy activo durante las últimas décadas ha sido la búsqueda de peptidomiméticos, moléculas diseñadas para mimetizar las propiedades de unión de los péptidos bioactivos con el fin de reproducir su estructura y su función, a la vez que intentan optimizar sus propiedades biológicas y/o farmacológicas.⁴²

Se han descrito una gran variedad de metodologías y estrategias para la transformación de los péptidos en peptidomiméticos.⁴³ El diseño racional de peptidomiméticos a partir de los péptidos bioactivos comprende una serie de etapas en las que se va perdiendo paulatinamente la naturaleza peptídica mediante modificaciones estructurales sucesivas hasta poder obtener, en una última etapa, una estructura no peptídica o peptidomimético. En este proceso hay dos aspectos fundamentales: la identificación de los aminoácidos claves y la definición de la conformación bioactiva.^{42,43}

Dentro de las diferentes clasificaciones de los peptidomiméticos que se han establecido, en esta Tesis Doctoral nos hemos centrado en la clasificación realizada en 2015 por Grossmann y colaboradores⁴⁴, los cuales establecen una nueva clasificación de los peptidomiméticos como inhibidores de IPPs en cuatro grandes grupos (Clases A-D), en función del grado de similitud con el péptido precursor. Así, de la Clase A a la D se va reduciendo progresivamente el carácter peptídico de las estructuras (Figura I.13).

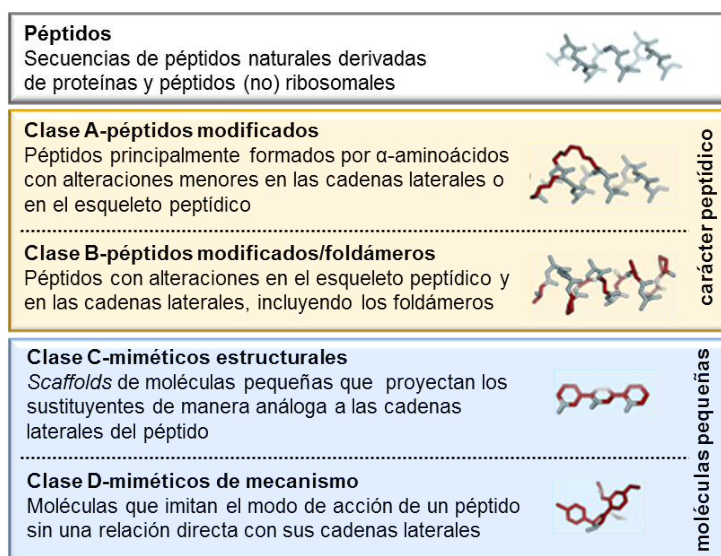


Figura I.13. Clasificación de los peptidomiméticos realizada por Grossman y col. (figura adaptada de la referencia⁴⁴).

- Los miméticos de **Clase A** son péptidos modificados en los que se introducen pequeñas alteraciones en el esqueleto peptídico (o *backbone*) o en las cadenas laterales para estabilizar la conformación bioactiva del péptido precursor. En este grupo de miméticos se encuentran, por ejemplo, los péptidos cíclicos, sea cual sea su estrategia de ciclación.

- A la **Clase B** de miméticos pertenecen estructuras en las que se introducen aminoácidos no naturales y/o alteraciones principalmente en el esqueleto de los péptidos precursores. En este tipo de miméticos podemos incluir los foldámeros y los peptoides.

- En la **Clase C** (miméticos estructurales) se incluyen compuestos altamente modificados (con carácter de molécula pequeña) en los que se sustituye por completo el esqueleto del péptido precursor por otro de naturaleza no peptídica (*scaffold*). En estos esqueletos se introducen los residuos clave (*hot spots*) con una orientación análoga a la del péptido original en su conformación bioactiva. A esta clase pertenecen, por ejemplo, los miméticos estructurales de hélices α o proteomiméticos.

- Por último, los miméticos de **Clase D** (miméticos mecanísticos) son moléculas capaces de imitar el modo de acción de un péptido bioactivo sin una relación directa con la funcionalidad de sus cadenas laterales. Estas moléculas pueden generarse en un programa de optimización posterior de miméticos de la Clase C, o bien identificarse a partir del cribado de quimiotecas de compuestos o mediante técnicas de cribado virtual.

En el campo de la búsqueda de moduladores de IPPs, algunas proteínas como los receptores acoplados a proteínas-G, reguladores de la apoptosis MDM2/MDMX y la familia de proteínas BCL-2, se han convertido en sistemas modelo ampliamente utilizados para probar la aplicabilidad de los distintos tipos de peptidomiméticos. Un ejemplo significativo, que nos servirá para ilustrar las diferentes estrategias utilizadas en la búsqueda de los mismos, son las proteínas MDM2 (del inglés *murine double minute 2*) y MDMX, reguladores negativos del supresor tumoral p53.

El factor de transcripción p53, en respuesta al estrés celular, interviene en procesos de reparación del ADN, la detención del ciclo celular y la apoptosis.^{45,46} En muchos tipos de cánceres se ha detectado una activación o sobreexpresión de los reguladores apoptóticos proteína MDM2/MDMX, por lo que la interacción entre estas proteínas y el factor p53 se ha convertido en una importante diana en las estrategias anticancerosas. Se ha descrito la estructura cristalográfica del complejo MDM2 con el dominio *N*-terminal de transactivación de p53⁴⁷, observándose que dicho dominio presenta una conformación de hélice α en su interacción con MDM2. En la Figura I.14a se muestran en detalle los residuos de p53, que se han identificado como residuos claves o *hot spots* (Phe19, Trp23 y Leu26)⁴⁷ en dicha interacción. Basándose en esta información estructural se diseñaron péptidos, que contenían los *hot spots*,

que resultaron ser inhibidores duales de las interacciones p53-MDM2 y p53-MDMX pero, que sin embargo, no mostraron suficiente permeabilidad celular y estabilidad proteolítica.⁴⁸⁻⁵⁰ Con el fin de mejorar estas propiedades, se diseñaron una gran variedad de peptidomiméticos basados en esos péptidos precursores. A continuación, comentaremos algunas de las estrategias utilizadas para la obtención de miméticos de las distintas clases.

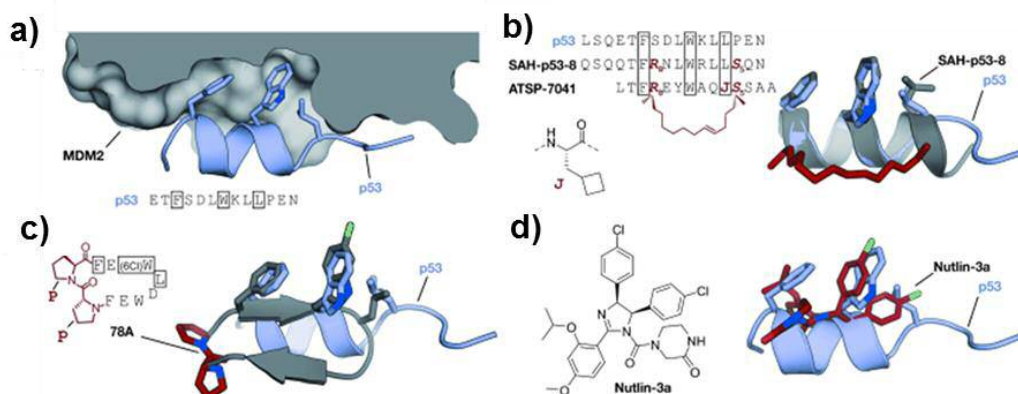


Figura I.14. a) Estructura cristalográfica de MDM2 (gris) con el dominio de transactivación p53 (azul, PDB 1YCR). b) Secuencias de los péptidos grapados. Superposición de la estructura cristalina de p53 (azul, PDB 1YCR) y SAH-p53-8 (gris, rojo PDB 3V3B). c) Superposición de la estructura cristalográfica de p53 y el péptido cíclico de horquilla- β 78A (PDB 2AXI). d) Superposición de la estructura cristalina de p53 (azul, PDB 1YCR) y nutlina-3a (rojo, PDB 4HG7). Todas las estructuras superpuestas se obtuvieron de complejos con MDM2 o MDMX. (Figura adaptada de la referencia).⁴⁴

Uno de los primeros ejemplos de miméticos de clase A diseñados fue un octapéptido con cuatro aminoácidos no naturales que se une a HDM2 con afinidades nanomolares, aunque, sin embargo, mostró de nuevo una baja absorción celular y una resistencia proteolítica muy limitada.⁵¹⁻⁵⁴ Posteriormente, se han descrito otros miméticos de clase A utilizando estrategias de ciclación a través de las cadenas laterales de dos residuos, mejorando la permeabilidad celular y la estabilidad proteolítica de los péptidos.⁵⁵ Así, por ejemplo, se han descrito péptidos grapados (con puentes hidrocarbonados) a través de las posiciones i, i+7 (SAH-p53, Figura I.14b), que han mejorado la estructura de hélice α , la afinidad por MDM2 y la estabilidad proteolítica en comparación con el péptido prototipo. Una optimización posterior de la secuencia, mediante la sustitución de los aminoácidos con carga negativa por aminoácidos polares y de algunos residuos polares por Arg, condujo a una mejora de la permeabilidad de estos peptidomiméticos, una inducción de la apoptosis y una supresión del crecimiento tumoral *in vivo*.^{56,57} Recientemente, Aileron Therapeutics ha desarrollado otras series de péptidos grapados que han mostrado una alta

especificidad y afinidad por MDM2 y MDMX, encontrándose un candidato de esta serie actualmente en ensayos clínicos.⁵⁸

Por otro lado, Robinson y col.⁵⁹ incluyeron los residuos clave de la hélice p53 en un péptido cíclico cabeza-cola, estabilizado como horquilla β a través de una plantilla D-Pro-L-Pro (Figura I.13c). Esta estructura mostró una buena afinidad a HDM2 en el sitio de interacción de p53.⁶⁰ Esta innovadora aproximación representa uno de los pocos ejemplos que utilizan una estructura estabilizada de horquilla β como inhibidor de IPPs ilustrando asimismo la capacidad de intercambio entre los dos tipos de estructuras secundarias.

En el diseño de miméticos de clase B se han utilizado foldámeros como inhibidores de la interacción p53-MDM2. Así, por ejemplo, se han preparado β -péptidos en los que se mejoran las afinidades de las primeras series de miméticos mediante la introducción de cadenas laterales de residuos no naturales.^{61,62} En este tipo de miméticos es necesaria la conjugación con péptidos de penetración celular, entre otras aproximaciones, para mejorar el paso a través de membranas.⁶³

Recientemente, se han descrito miméticos estructurales de clase C para inhibir la interacción entre p53 y MDM2. En estos miméticos cabe destacar el empleo de esqueletos de terfenilo sustituidos con grupos alifáticos en sus extremos y sustituyentes aromáticos en las posiciones centrales, para mimetizar el epítipo de unión de p53. Esos miméticos muestran una mayor afinidad por MDM2⁶⁴, resultando activos en ensayos celulares⁶⁵. Asimismo, el empleo de pirrolopirimidinas⁶⁶ también ha conducido a buenos inhibidores de la interacción p53-MDM2 y p53-MDMX induciendo la apoptosis o muerte celular de las células cancerosas. En el Capítulo 3 se dará más detalles de este tipo de estructuras.

Finalmente, un cribado de alto rendimiento (HTS) de quimiotecas de compuestos sintéticos, ha permitido identificar peptidomiméticos de clase D, que tras una optimización posterior condujeron a la familia de las nutlinas. Concretamente, la nutlina-3 fue la molécula más potente con una actividad en el orden nanomolar frente al complejo p53-MDM2⁶⁷. Estos esqueletos rígidos orientan de manera adecuada los residuos claves de p53 como puede observarse en la superposición de las estructuras cristalinas de p53 y la nutlina-3a (en azul y rojo en la Figura I.13d).⁶⁸ Estas moléculas pequeñas, por tanto, se adaptan al lugar de interacción de MDM2 con p53, evitan su unión y de esta manera bloquean la división celular y desencadenan procesos de apoptosis.

OBJETIVOS GENERALES

I.3. OBJETIVOS GENERALES

El trabajo descrito en la presente Tesis Doctoral se engloba dentro de una línea de investigación desarrollada en nuestro grupo de trabajo, a lo largo de los últimos cinco años, encaminada a progresar en una novedosa aproximación en la inhibición de la tripanotión reductasa de *Leishmania infantum* (Li-TryR), como es la inhibición del proceso de dimerización, como un nuevo mecanismo alternativo de inhibición de la enzima, muy poco explorado hasta el momento, que podría dar lugar a nuevas familias de inhibidores más potentes y selectivos.

Como punto de partida de este trabajo se ha utilizado como prototipo el péptido lineal **P2** ("hit") derivado de una hélice α presente en la interfaz de dimerización de la Li-TryR previamente identificada como *hot spot* en nuestro grupo de investigación.

El objetivo global de esta Tesis ha consistido en la optimización del péptido prototipo para desarrollar nuevo(s) cabeza(s) de serie más potentes y con mejores propiedades farmacocinéticas. Para conseguir este objetivo, se han diseñado, sintetizado y evaluado biológicamente diferentes tipos de peptidomiméticos en los que se ha ido reduciendo progresivamente el carácter peptídico. El trabajo realizado se ha recopilado en tres capítulos.

En el Capítulo 1, se pretende la optimización tanto de la actividad como de la estabilidad química y/o proteolítica del prototipo **P2**. Para ello se plantean distintas modificaciones en su estructura con el diseño, síntesis y evaluación frente a la enzima de péptidos lineales y peptidomiméticos de Clase A (péptidos cíclicos) y B (foldámeros).

En el Capítulo 2 se describe la evaluación *in vitro* de la actividad leishmanicida y de la citotoxicidad de los péptidos y peptidomiméticos más significativos obtenidos en el Capítulo 1. Asimismo, se estudia la capacidad de dichos péptidos y peptidomiméticos de atravesar las membranas celulares uniéndolos a sondas fluorescentes y/o a diferentes tipos de péptidos de penetración celular evaluando la actividad leishmanicida frente a amastigotes y promastigotes así como la citotoxicidad de los correspondientes conjugados.

En el Capítulo 3 se pretende la obtención de peptidomiméticos de naturaleza no peptídica siguiendo dos estrategias diferentes. Para ello, se realiza un estudio previo de la interfaz de dimerización y se propone un modelo farmacofórico de interacción del péptido prototipo **P2** con el monómero de la proteína. La primera estrategia para la

OBJETIVOS

obtención de los peptidomiméticos consiste en el diseño y síntesis de miméticos estructurales de hélices α o proteomiméticos (peptidomiméticos de clase C) en los que se emplea un esqueleto o *scaffold* central decorado con las cadenas laterales de los tres residuos más importantes (i, i+3 e i+7) en la interacción del prototipo **P2** con la enzima. En la segunda estrategia, se realiza un cribado virtual de dos quimiotecas (NCI e IQM) teniendo en cuenta asimismo el modelo de farmacóforo propuesto.

Los ensayos enzimáticos de actividad y de dimerización, así como la evaluación *in vitro* de la actividad leishmanicida y de la citotoxicidad de todas las moléculas sintetizadas en esta tesis doctoral, han sido realizados por el grupo del Dr. Antonio Jiménez de la Universidad de Alcalá.

Los objetivos más concretos se detallan al principio de cada uno de los capítulos de esta Memoria.

BIBLIOGRAFÍA

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Herwaldt, B.L. Leishmaniasis. *Lancet*, **1999**, *354*, 1191-1199.
2. URL: <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en>
3. Enserink, M. Has leishmaniasis become endemic in the U.S.? *Science*, **2000**, *290*, 1881-1883.
4. Rosypal, A. C.; Troy, G. C.; Zajac, A. M.; Duncan, R. B. Jr; Waki, K.; Chang, K. P.; Lindsay, D. S. Emergence of zoonotic canine leishmaniasis in the United States: isolation and immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* from foxhounds from Virginia. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **2003**, *50*, 691-693.
5. Murray, H. W.; Berman, J. D.; Davies, C. R.; Saravia, N. G. Advances in Leishmaniasis. *Lancet*, **2005**, *366*, 1561-1577.
6. Desjeux, P. Leishmaniasis. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 692-693.
7. Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2004**, *27*, 305-318.
8. URL: <http://www.dpd.cdc.gov>. DPDx: Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern.
9. Carrión, J. Folgueira, C.; Alonso, C. Development of immunization strategies against leishmaniasis based on the *Leishmania* histones pathoantigens. *Procedia Vaccinol.* **2009**, *1*, 101-103.
10. Tiuman, T. S.; Santos, A. O.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B. P.; Nakamura, C. V. Recent advances in leishmaniasis treatment. *Int. J. Infect. Dis.*, **2011**, *15*, 525-532.
11. Silva-Jardim, I.; Thiemann, O. H.; Anibal, F. F. Leishmaniasis and Chagas Disease Chemotherapy: a Critical Review. *J. Braz. Chem. Soc.* **2014**, *25*, 1810-1823.
12. Croft, S. L.; Sundar, S.; Fairlamb, A. H., Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 111-126.
13. Bray, P. G.; Barrett, M. P.; Ward, S. A.; de Koning, H. P. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends in Parasitology.* **2003**, *19*, 232-239.

BIBLIOGRAFÍA

14. Sundar, S.; Metha, H.; Suresh, A. V.; Singh, S. P.; Rai, M.; Murray, H. W. Amphotericin B treatment for Indian Visceral Leishmaniasis: Conventional versus Lipid Formulations. *Clin. Inf. Dis.* **2004**, *38*, 377-383.
15. Sundar, S.; Jha, T. K.; Thakur, C. P.; Engel, J.; Sindermann, H.; Fischer, C.; Junge, K.; Bryceson, A. Oral miltefosine for indian visceral leishmaniasis. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *347*, 1739-1746.
16. Sundar, S.; Murray, H. W. Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India. *Bull World Health Organ.* **2005**, *83*, 394-395.
17. Croft, S. L.; Yardley, V.; Kendrick, H. Drug sensitivity of *Leishmania* species: some unresolved problems. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2002**, *96*, 127-129.
18. Fairlamb, A. H.; Blackburn, P.; Ulrich, P.; Chait, B. T.; Cerami, A. Trypanothione-a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science.* **1985**, *227*, 1485-1487.
19. Ivens, A. C.; Peacock, C. S.; Worthey, E. A.; Murphy, L.; Aggarwal, G. et al. The genome of the kinetoplastid parasites, *Leishmania major*. *Science* **2005**, *309*, 436-442.
20. Marsh, I. R.; Bradley, M. Substrate specificity of trypanothione reductase. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *243*, 690-694.
21. Krieger, S.; Schwarz, W.; Ariyanayagam, M. R.; Fairlamb, A. H.; Krauth-Siegel, R. L.; Clayton, C. Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Mol. Microbiol.* **2000**, *35*, 542-552.
22. Krauth-Siegel, R. L.; Enders, B.; Henderson, G. B.; Fairlamb, A. H.; Schirmer, R. H. Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem.* **1987**, *164*, 123-128.
23. Baiocco, P.; Colotti, G.; Franceschini, S.; Ilari, A. Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2603-2612.
24. Leichus, B. N.; Bradley, M.; Nadeau, K.; Walsh, C. T.; Blanchard, J. S. Kinetic isotope effect analysis of the reaction catalyzed by *trypanosoma congolense* trypanothione reductase. *Biochemistry.* **1992**, *31*, 6414-6420.

25. Dumas, C.; Ouellette, M.; Tovar, J.; Cunningham, M. L.; Fairlamb, A. H.; Tamar, S.; Olivier, M.; Papadopoulos, B. Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *EMBO J.* **1997**, *16*, 2590-2598.
26. Garforth, J.; Yin, H.; McKie, J. H.; Douglas, K. T., and Fairlamb, A. H. Rational design of selective ligands for trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Structural effects on the inhibition by dibenzazepines based on imipramine. *J. Enzyme Inhib.* **1997**, *12*, 161-173.
27. Saravanamuthu, A.; Vickers, T. J.; Bond, C. S.; Peterson, M. R.; Hunter, W. N.; Fairlamb, A. H., Two interacting binding sites for quinacrine derivatives in the active site of trypanothione reductase: a template for drug design. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 29493-29500.
28. Patterson, S.; Alpey, M. S.; Jones, D. C.; Shanks, E. J.; Street, I. P.; Frearson, J. A.; Wyatt, P. G.; Gilbert, I. H.; Fairlamb, A. H., Dihydroquinazolines as a Novel Class of *Trypanosoma brucei* Trypanothione Reductase Inhibitors: Discovery, Synthesis, and Characterization of their Binding Mode by Protein Crystallography. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6514-6530.
29. Walton, J. G. A.; Jones, D. C.; Kiuru, P. A.; Durie, J.; Westwood, N. J.; Fairlamb, A. H. Synthesis and evaluation of indatraline-based inhibitors for trypanothione reductase. *ChemMedChem* **2011**, *6*, 321-328.
30. Maccari, G.; Jaeger, T.; Moraca, F.; Biava, M.; Flohé, L.; Botta, M. A fast virtual screening approach to identify structurally diverse inhibitors of trypanothione reductase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5255-5258.
31. Eberle, C.; Lauber, B. S.; Fankhauser, D.; Kaiser, M.; Brun, R.; Krauth-Siegel, R. L.; Diederich, F. *ChemMedChem*. **2011**, *6*, 292-301.
32. Perez-Pineiro, R.; Burgos, A.; Jones, D. C.; Andrew, L. C.; Rodriguez, H.; Suarez, M.; Fairlamb, A. H.; Wishart, D. S. Development of a novel virtual screening cascade protocol to identify potential trypanothione reductase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1670-1680.
33. Patterson, S.; Jones, D. C.; Shanks, E. J.; Frearson, J. A.; Gilbert, I. H.; Wyatt, P. G.; Fairlamb, A. H. Synthesis and evaluation of 1-(1-(benzo[b]thiophen-2-yl)cyclohexyl)piperidine (BTCP) analogues as inhibitors of trypanothione reductase. *ChemMedChem*. **2009**, *4*, 1341-1353.
34. Eberle, C.; Burkhard, J. A.; Stump, B.; Kaiser, M.; Brun, R.; Krauth-Siegel, R. L.; Diederich, F. Synthesis, inhibition potency, binding mode, and antiprotozoal activities of fluorescent inhibitors of trypanothione reductase based on mepacrine-conjugated diaryl sulfide scaffolds. *ChemMedChem*. **2009**, *4*, 2034-2044.

BIBLIOGRAFÍA

35. Richardson, J. L.; Nett, I. R. E.; Jones, D. C.; Abdille, M. H.; Gilbert, I. H.; Fairlamb, A. H. Improved tricyclic inhibitors of trypanothione reductase by screening and chemical synthesis. *ChemMedChem*. **2009**, 4, 1333-1340.
36. Spinks, D.; Shanks, E. J.; Cleghorn, L. A. T.; McElroy, S.; Jones, D.; James, D.; Fairlamb, A. H.; Frearson, J. A.; Wyatt, P. G.; Gilbert, I. H. Investigation of trypanothione reductase as a drug target in *Trypanosoma brucei*. *ChemMedChem*. **2009**, 4, 2060-2069.
37. Wells, J. A.; McClendon, C. L. Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces. *Nature*. **2007**, 450, 1001-1009.
38. Thangudu, R. R.; Bryant, S. H.; Panchenco, A. R.; Madej, T. Modulating Protein-Protein Interactions with Small Molecules: The Importance of Binding Hotspots. *J. Mol. Biol.* **2012**, 415, 443-453.
39. Posteriormente apareció la estructura de Rayos X de TryR de *L. infantum*, que permitió ver la gran similitud entre el modelo por homología inicialmente construido y la estructura de Rayos X.
40. Moreno, D. Estrategias celulares y moleculares en el cribado de nuevos agentes anti-*Leishmania*. Tesis Doctoral. **2010**. Universidad de Alcalá.
41. Sánchez, P. A. Interacciones proteína-proteína como diana terapéutica en la transcriptasa inversa del VIH-1 y en la tripanotión reductasa de *Leishmania infantum*. Tesis Doctoral. **2013**. Universidad Complutense de Madrid.
42. Trabocchi, A.; Guarna, A. *Peptidomimetics in Organic and Medicinal Chemistry*. John Wiley & Sons. **2014**.
43. Estiarte, M. A.; Rich, D. A. Peptidomimetics for drug design. Burger's Medicinal Chemistry and drug discovery. **2003**, 633-685.
44. Pelay-Gimeno, M.; Glas, A.; Koch, O.; Grossmann, T. N. Structure-based design of inhibitors of protein-protein interactions: mimicking peptide binding epitopes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 8896-8927.
45. Vogelstein, B.; Lane, D.; Levine, A. J. Surfing the p53 network. *Nature*. **2000**, 408, 307-310.
46. Chène, P. Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*. **2003**, 3, 102-109.

47. Kussie, P. H.; Gorina, S.; Marechal, V.; Elenbaas, B.; Moreau, J.; Levine, A. J.; Pavletich, N. P. Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science*. **1996**, *274*, 948-953.
48. Liu, M.; Pazgier, M.; Li, C.; Yuan, W.; Li, C.; Lu, W. A left-handed solution to peptide inhibition of the p53-MDM2 interaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3649-3652.
49. Liu, M.; Li, C.; Pazgier, M.; Li, C.; Mao, Y.; Lv, B.; Gu, B.; Wei, G.; Yuan, W.; Zhan, C.; Lu, W. Y.; Lu, W. D-peptide inhibitors of the p53-MDM2 interaction for targeted molecular therapy of malignant neoplasms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2010**, *107*, 14321-14326.
50. Zhan, C.; Zhao, X.; Wei, X.; Wu, X.; Chen, X.; Yuan, W.; Lu, W. Y.; Pazgier, M.; Lu, W. An ultrahigh affinity d-peptide antagonist of MDM2. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6237-6241.
51. Bottger, V.; Bottger, A.; Howard, S. F.; Picksley, S. M.; Chene, P.; García-Echeverría, C.; Hochkeppel, H. K.; Lane, D. P. Identification of novel mdm2 binding peptides by phage display. *Oncogene*. **1996**, *13*, 2141-2147.
52. Sakurai, K.; Schubert, C.; Kahne, D. Crystallographic Analysis of an 8-mer p53 Peptide Analogue Complexed with MDM2. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11000-11001.
53. García-Echeverría, C.; Chène, P.; Blommers, M. J. J.; Furet, P. Discovery of potent antagonists of the interaction between human double minute 2 and tumor suppressor p53. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3205-3208.
54. Chene, P.; Fuchs, J.; Bohn, J.; García-Echeverría, C.; Furet, P.; Fabbro, J. A small synthetic peptide, which inhibits the p53-hdm2 interaction, simulates the p53 pathway in tumour cell lines. *J. Mol. Biol.* **2000**, *299*, 245-253.
55. Baek, S.; Kutchukian, P. S.; Verdine, G. L.; Huber, R.; Holak, T. A.; Lee, K. W.; Popowicz, G. M. Structure of the stapled p53 peptide bound to Mdm2. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 103-106.
56. Bernal, F.; Tyler, A. F.; Korsmeyer, S. J.; Walensky, L. D.; Verdine, G. L. Reactivation of the p53 Tumor Suppressor Pathway by a Stapled p53 Peptide. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2456-2457.
57. Bernal, F.; Wade, M.; Godes, M.; Davis, T. N.; Whitehead, D. G.; Kung, A. L.; Wahl, G. M.; Walensky, L. D. A Stapled p53 Helix Overcomes HDMX-Mediated Suppression of p53. *Cancer Cell*. **2010**, *18*, 411-422.

58. Chang, Y. S.; Graves, B.; Guerlavais, V.; Tovar, C.; Packman, K.; To, K. H.; Olson, K. A.; Kesavan, K.; Gangurde, P.; Mukherjee, A.; Baker, T.; Darlak, K.; Elkin, C.; Filipovic, Z.; Qureshi, F. Z.; Cai, H.; Berry, P.; Feyfant, E.; Shi, X. E.; Horstick, J.; Annis, D. A.; Manning, A. M.; Fotouhi, N.; Nash, H.; Vassilev, L. T.; Sawyer, T. K. Stapled α -helical peptide drug development: a potent dual inhibitor of MDM2 and MDMX for p53-dependent cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2013**, *110*, E3445-E3454.
59. Fasan, R.; Dias, R. L. A.; Moehle, K.; Zerbe, O.; Vrijbloed, J.W.; Obrecht, D.; Robinson, J. A. Using a β -Hairpin To Mimic an α -Helix: Cyclic Peptidomimetic Inhibitors of the p53–HDM2 Protein–Protein Interaction. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2004**, *43*, 2109-2112.
60. Fasan, R.; Dias, R. L.; Moehle, K.; Zerbe, O.; Obrecht, D.; Mittl, P. R.; Grutter, M. G.; Robinson, J. A. Structure-activity studies in a family of beta-hairpin protein epitope mimetic inhibitors of the p53-HDM2 protein-protein interaction. *ChemBioChem*. **2006**, *7*, 515-526.
61. Harker, E. A.; Daniels, D. S.; Guarracino, D. A.; Schepartz, A. β -peptides with improved affinity for HDM2 and HDMX. *Bioorg. Med. Chem*. **2009**, *17*, 2038-2046.
62. Michel, J.; Harker, E. A.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L.; Schepartz, A. In silico improvement of β^3 -peptide inhibitors of p53HDM2 and p53HDMX. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6356-6357.
63. Hintersteiner, M.; Kimmerlin, T.; Garavel, G.; Schindler, T.; Bauer, R.; Meisner, N. C.; Seifert, J. M.; Uhl, V.; Auer, M. A highly potent and cellularly active beta-peptidic inhibitor of the p53/HDM2 interactions. *ChemBioChem*. **2009**, *10*, 994-998.
64. Yin, H.; Lee, G. I.; Park, H. S.; Payne, G. A.; Rodríguez, J. M.; Sebt, S. M.; Hamilton, A. D. Terphenyl-Based Helical Mimetics That Disrupt the p53/HDM2 Interaction. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2005**, *44*, 2704-2707.
65. Chen, L.; Yin, H.; Farooqi, B.; Sebt, S.; Hamilton, A. D.; Chen, J. p53 α -Helix mimetics antagonize p53/MDM2 interaction and activate p53. *Mol. Cancer Ther.* **2005**, *4*, 1019-1025.
66. Lee, J. H.; Zhang, Q.; Jo, S.; Chai, S. C.; Oh, M.; Im, W.; Lu, H.; Lim, H. S. Novel pyrrolopyrimidine-based α -helix mimetics: cell-permeable inhibitors of protein-protein interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 676-679.
67. Wade, M.; Li, Y. C.; Wahl, G. M. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*. **2013**, *13*, 83-96.

68. Anil, B.; Riedinger, C.; Endicott, J. A.; Noble, M. E. The structure of an MDM2-Nutlin-3a complex solved by the use of a validated MDM2 surface-entropy reduction mutant. *Acta Crystallogr. Sect. D.* **2013**, 69, 1358-1366.

CAPÍTULO 1: PÉPTIDOS LINEALES, PÉPTIDOS CÍCLICOS Y FOLDÁMEROS

1. PÉPTIDOS LINEALES, PÉPTIDOS CÍCLICOS Y FOLDÁMEROS

En este Capítulo, se pretende mejorar la estabilidad, tanto química como metabólica, así como favorecer la permeabilidad celular del péptido prototipo **P2**¹ (Ac-PKIIQSVGISMKM-NH₂), manteniendo o mejorando su actividad frente a *Li*-TryR. Para lograr dichos objetivos, se han estudiado tres series de compuestos: péptidos lineales (Serie 1), péptidos cíclicos (Serie 2) y foldámeros (Serie 3). Las Series 2 y 3 incluyen miméticos de Clase A y B, respectivamente, según la clasificación de Grossman y colaboradores² comentada en los antecedentes.

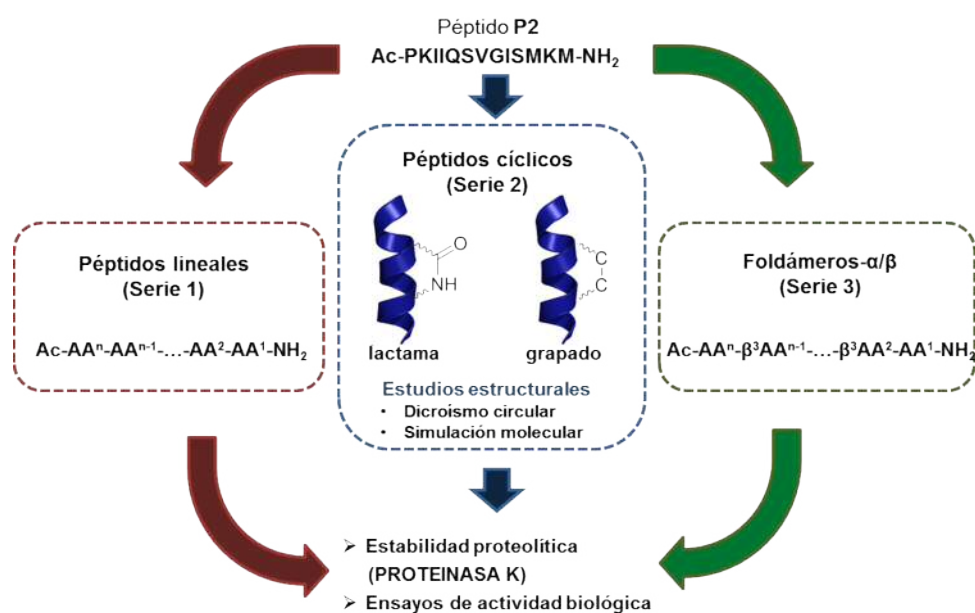


Figura 1.1. Objetivos del Capítulo 1.

Respecto a los péptidos lineales (Serie 1), se han sustituido los dos residuos de Met presentes en el péptido prototipo por residuos hidrófobos similares de Nle que no presentan problemas de oxidación, y se han preparado péptidos truncados para determinar la longitud mínima necesaria para la actividad.

En cuanto a los péptidos cíclicos (Serie 2) se han preparado péptidos conformacionalmente restringidos en los que se ha introducido bien, un enlace covalente de tipo amida (CONH) o bien un enlace carbono-carbono (péptidos grapados) entre las cadenas laterales de dos residuos de la secuencia peptídica. Con ello, se pretende aumentar el grado de helicidad α en disolución respecto al péptido lineal prototipo y mejorar así su estabilidad proteolítica. Además, el empleo de péptidos grapados podría favorecer el paso a través de membranas celulares para su posterior ensayo en cultivo celular frente a los parásitos, aspectos que se comentarán en el Capítulo 2.

Por otro lado, se ha llevado a cabo la síntesis y evaluación biológica de foldámeros (Serie 3), estructuras peptídicas que incorporan residuos no naturales de β^3 -aminoácidos en algunos de los residuos de la secuencia siguiendo diferentes patrones de sustitución, con el fin de mejorar la estabilidad proteolítica.

Además, en este Capítulo se han realizado estudios estructurales de dicroísmo circular y de simulación molecular de los péptidos cíclicos, así como estudios de proteólisis de los peptidomiméticos más representativos de cada serie frente a la proteinasa K, una proteasa de amplio espectro.

A continuación, se recogen de manera detallada los resultados obtenidos.

1.1. Péptidos lineales (Serie 1)

En ensayos biológicos previos se había observado una pérdida progresiva de la actividad biológica de las disoluciones *stock* patrón en DMSO del péptido prototipo **P2** (Ac-Pro-Lys-Ile-Ile-Gln-Ser-Val-Gly-Ile-Ser-Met-Lys-Met-NH₂). Un análisis detallado de los cromatogramas de HPLC-MS de estas disoluciones mostraba que los dos residuos de Met presentaban problemas de oxidación. Con el fin de evitar estos problemas de oxidación y así mejorar la estabilidad química del péptido **P2** se sustituyeron dichos residuos de Met por residuos bioisósteros de Nle, un aminoácido no natural (**1.01**). La sustitución de Met por Nle en secuencias peptídicas es una estrategia estándar³ para evitar problemas de oxidación, ya que se mantiene el mismo número de eslabones en la cadena lateral así como su carácter hidrófobo. Además, se prepararon péptidos lineales truncados eliminando progresivamente residuos del extremo C-terminal (**1.02-1.06**) para determinar la longitud mínima necesaria para la actividad. En la Figura 1.2 se reflejan los péptidos objetivo de la Serie 1.

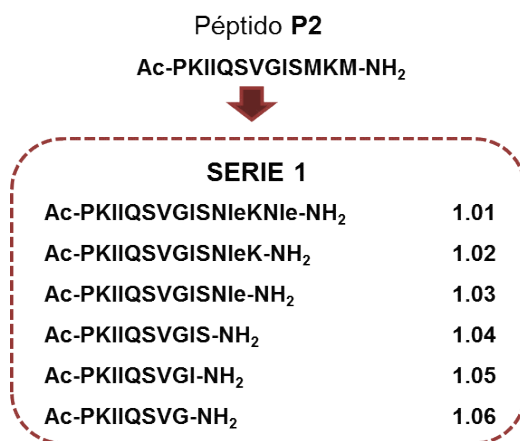


Figura 1.2. Péptido prototipo modificado (**1.01**) y péptidos truncados en el extremo C-terminal (**1.02-1.06**).

1.1.1. Síntesis de los péptidos lineales

La preparación de los péptidos objetivo se llevó a cabo mediante síntesis manual en fase sólida (SPPS, *Solid Phase Peptide Synthesis*), siguiendo una estrategia de protección ortogonal Fmoc/^tBu. La resina utilizada como soporte de la reacción fue una resina poliestirénica MBHA de tipo amida *Rink* de carga 0.56 mmol/g.

El método de síntesis en fase sólida consiste en la unión del aminoácido del extremo C-terminal a un soporte polimérico insoluble (resina) y la posterior elongación secuencial, aminoácido tras aminoácido, de la cadena peptídica hacia el extremo N terminal. Se escogió la estrategia de protección ortogonal Fmoc/^tBu, en la que se emplea el grupo Fmoc como grupo protector temporal del α amino y los grupos tipo *terc*-butilo (^tBu) para la protección de las cadenas laterales. El grupo protector temporal (Fmoc) se elimina antes de la unión del siguiente aminoácido en medio básico (20% piperidina/DMF, v/v). Una vez que el grupo α amino se encuentra libre, se une el aminoácido siguiente, previa activación de su grupo α carboxilo. Este proceso se repite hasta completar la secuencia peptídica deseada. En el acoplamiento se utilizó DIEA como base y HCTU⁴⁻⁶ como agente de acoplamiento (Figura 1.3). Este agente de acoplamiento es tan efectivo como otros, tales como HATU o HBTU, y permite obtener péptidos de mayor pureza. Además, su bajo coste ha hecho que se considere como una buena alternativa para la síntesis de péptidos en fase sólida.⁷

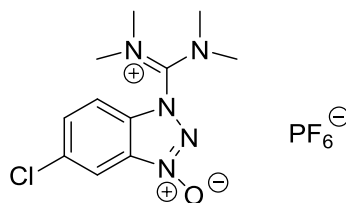
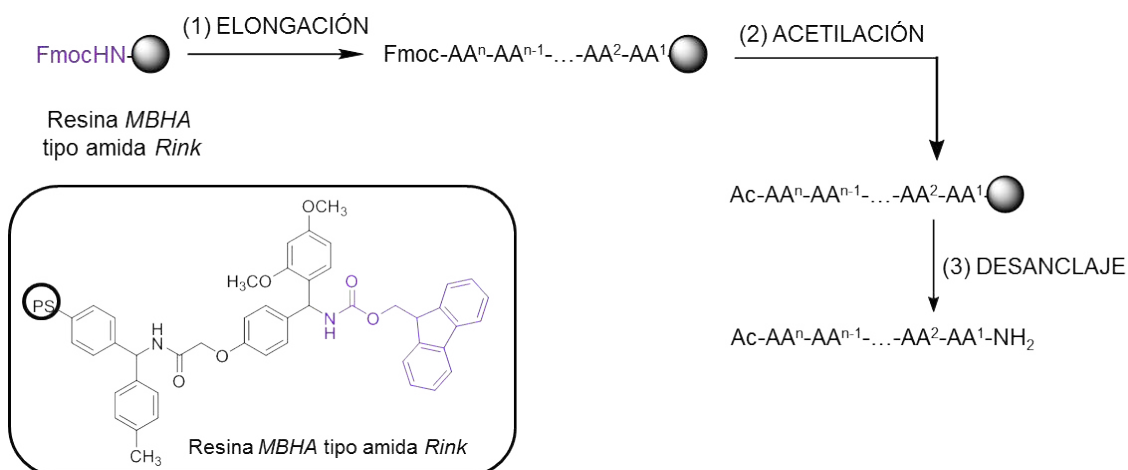


Figura 1.3. Estructura del agente de acoplamiento HCTU.

Todos los péptidos se han sintetizado acetilados en el extremo N-terminal y en forma de carboxamidas en el extremo C-terminal con el fin de aumentar su estabilidad frente a proteasas.

El seguimiento de las reacciones de acoplamiento fue monitorizado con un ensayo colorimétrico cualitativo (Kaiser o cloranilo, según la naturaleza de la amina) o mediante el tratamiento acidolítico estándar de una pequeña porción de la peptidil resina y posterior análisis del crudo de desanclaje mediante HPLC acoplado a MS.

La síntesis de los péptidos lineales se llevó a cabo de manera manual en fase sólida y en tres etapas: (1) elongación de las peptidil-resinas lineales objetivo, (2) acetilación del extremo N-terminal, (3) desanclaje del soporte polimérico para la obtención de los péptidos objetivo (Esquema 1.1).



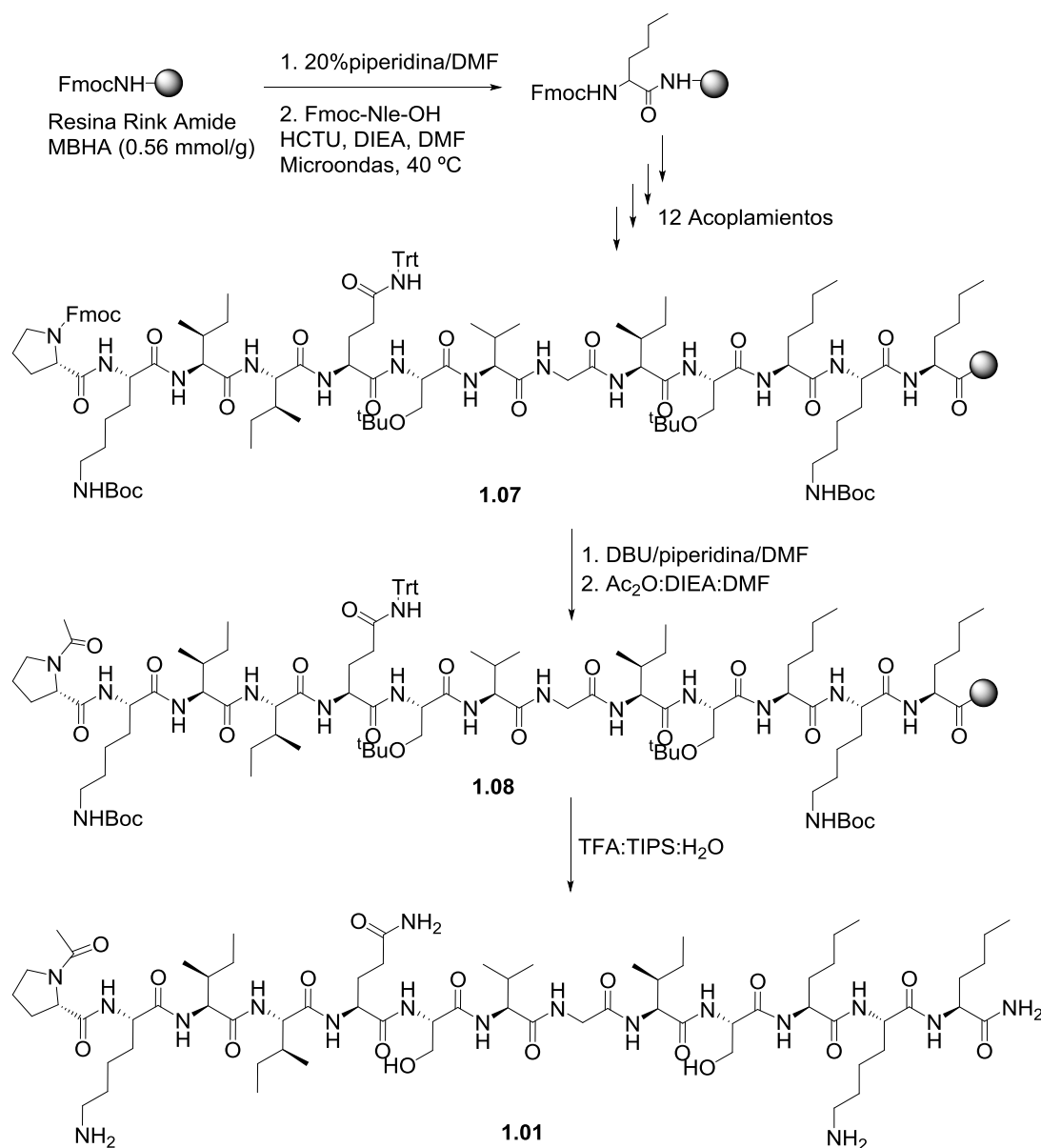
Esquema 1.1. Síntesis general de los péptidos lineales.

Siguiendo esta estrategia sintética se obtuvieron los péptidos lineales **1.01-1.06** (Figura 1.2).

En el Esquema 1.2 se muestra, como ejemplo, el procedimiento sintético utilizado para la preparación del péptido lineal **1.01**, portador de dos residuos de Nle en lugar de Met.

La síntesis de **1.01** comenzó con el anclaje del aminoácido Fmoc-Nle-OH a la resina. A continuación, se fueron introduciendo uno a uno y de manera secuencial los aminoácidos Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Nle-OH, Fmoc-Ser(^tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ser(^tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Pro-OH para obtener la peptidil-resina protegida en su forma Fmoc (**1.07**). Los acoplamientos se realizaron con 1.2 equivalentes de HCTU, 1.2 equivalentes de aminoácido y 2.4 equivalentes de DIEA, en DMF. Las reacciones se llevaron a cabo en el microondas⁸, realizando 3 ciclos de 10 minutos a 40 °C para cada uno de los acoplamientos. Esto nos permitió reducir los tiempos de reacción respecto a los acoplamientos que en otras ocasiones se habían realizado a temperatura ambiente durante 2 a 3 horas. Una vez completada la elongación y tras eliminar el grupo Fmoc, en presencia de un 1% de DBU y piperidina en DMF, se procedió a la protección del extremo N-terminal con un grupo acetilo, en

condiciones estándar ($\text{Ac}_2\text{O}:\text{DIEA}:\text{DMF}$, en proporciones 1:1:1), obteniéndose la peptidil-resina **1.08**. Finalmente, se llevó a cabo el desanclaje del péptido de la resina mediante el tratamiento acidolítico ($\text{TFA}:\text{TIPS}:\text{H}_2\text{O}$, en proporciones 95:2.5:2.5) y la precipitación del mismo sobre Et_2O frío. El crudo final liofilizado, se purificó por cromatografía de media presión (HPFC) en el Biotage®, lo que permitió aislar el péptido **1.01** con un 20% de rendimiento global y una pureza del 95%, determinada por HPLC.



Esquema 1.2. Síntesis del péptido lineal **1.01**.

La preparación de los péptidos truncados **1.03**, **1.04** y **1.06** se llevó a cabo siguiendo una estrategia similar, obteniéndose los péptidos deseados con

rendimientos globales entre un 35-44% y purezas superiores al 90% tras purificación cromatográfica.

Todos los péptidos sintetizados se caracterizaron por HPLC-analítico y espectrometría de masas de alta resolución. En la Tabla 1.1 se recogen los datos analíticos y los rendimientos globales de los péptidos lineales sintetizados. Los péptidos truncados **1.02** y **1.05** se obtuvieron de fuentes comerciales.

Tabla 1.1. Datos analíticos y rendimientos globales de los péptidos truncados.

Péptido	Fórmula molecular	Masa exacta calc.	m/z obs.	t _R [*] (min)	Pureza [*] (%)	Rto global (%)
1.01	C ₆₇ H ₁₂₁ N ₁₇ O ₁₇	1435.9186	1435.9126	12.58	95	20
1.02	C ₆₁ H ₁₁₀ N ₁₆ O ₁₆	1322.8329	1322.8286	7.87	99	-
1.03	C ₅₅ H ₉₈ N ₁₄ O ₁₅	1194.7369	1194.7336	8.44	93	35
1.04	C ₄₉ H ₈₇ N ₁₃ O ₁₄	1081.6538	1081.6495	7.26	>92	39
1.05	C ₄₆ H ₈₂ N ₁₂ O ₁₂	994.6215	994.6175	7.54	99	-
1.06	C ₄₀ H ₇₁ N ₁₁ O ₁₁	881.5345	881.5335	6.95	>93	44

^{*} Medido en HPLC analítico a 214 nm utilizando el gradiente 1 descrito en la parte experimental.

1.1.2. Evaluación biológica de los péptidos lineales

Los péptidos lineales descritos hasta este momento y los peptidomiméticos, cuya síntesis se comentará en los siguientes apartados, fueron evaluados en ensayos enzimáticos tanto de actividad como de dimerización de la TryR de *L. infantum* por el grupo del Dr. Antonio Jiménez de la Universidad de Alcalá (UAH).

Ensayo de inhibición de la actividad de la Li-TryR

Debido al elevado precio del tripanotión oxidado (TS₂), el sustrato natural de la TryR, el equipo del Dr. Jiménez ha puesto a punto un ensayo de actividad de la TryR por colorimetría⁹ (basado en el ensayo descrito por Hamilton y col.)¹⁰, que permite medir la actividad de la TryR mediante la detección de la aparición de TNB (Figura 1.4). En este ensayo, por cada molécula de NADPH que se reduce, se genera una molécula de ácido ditionitrobenzoico (DTNB), recuperándose dos de ácido tionitrobenzoico (TNB), regenerándose así el tripanotión oxidado que ha sido reducido previamente por la TryR. El progreso de la reacción se sigue por colorimetría analizando la absorción del TNB a 412 nm.

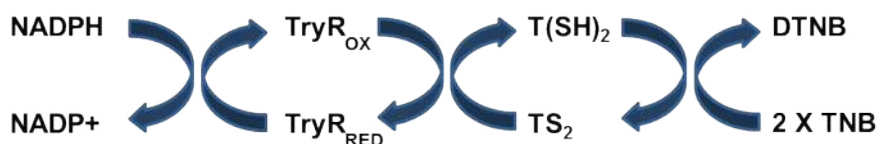


Figura 1.4. Ensayo de actividad de la TryR acoplado a DTNB. La TryR toma el poder reductor del NADPH oxidándolo, reduce el TS₂ a T(SH)₂ y éste vuelve a la forma oxidada por acción del DTNB.

La medida de la inhibición de la actividad se realiza incubando la enzima en presencia de distintas concentraciones de los péptidos (previamente disueltos en pequeñas cantidades de DMSO) siguiendo el curso de la reacción catalítica durante 60 minutos. Para cada uno de los péptidos, el experimento se repite tres veces.

Ensayo de inhibición del proceso de dimerización de la Li-TryR

Para los ensayos de dimerización el Profesor Jiménez ha diseñado un novedoso ensayo⁹, basado en un método descrito por Sluis-Cremer y col.¹¹ para medir la inhibición de la dimerización de la Transcriptasa Inversa (TI) del VIH, que consiste en marcar una TryR silvestre con un FLAG-*tag* y ponerla en contacto con otra TryR silvestre que está marcada con His-*tag*. El proceso de dimerización es un equilibrio entre los dímeros y los respectivos monómeros. Si se dejan las dos TryR en contacto el tiempo suficiente y en las condiciones adecuadas, se forma un determinado porcentaje de homodímero que portará tanto el His-*tag*, como el FLAG-*tag*. Después, en una placa tapizada con un anticuerpo anti-FLAG, se retienen selectivamente sólo las proteínas que tengan dicho *tag*, tanto el homodímero FLAG-*tag*/FLAG-*tag* como el dímero FLAG-*tag*/His-*tag*. Por último, se realiza un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) con un anticuerpo anti-His, de tal manera que se detecta de forma selectiva la formación de dímero FLAG-*tag*/His-*tag* (Figura 1.5).

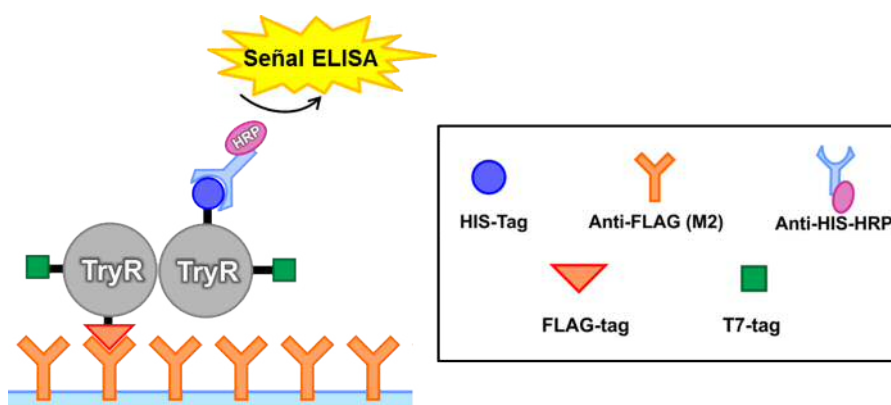


Figura 1.5. Ensayo de dimerización de la Li-TryR.

Para evaluar la capacidad de los compuestos para interferir en el proceso de dimerización de la TryR, se cuantifica mediante ELISA la cantidad de heterodímero formado en presencia de distintas concentraciones del compuesto en estudio y en ausencia del mismo. El experimento se repite tres veces.

En el ensayo de dimerización solamente se evaluaron algunos de los péptidos que habían mostrado buenos resultados en el ensayo de actividad enzimática.

Siguiendo los procedimientos descritos se evaluó tanto la inhibición de la actividad oxidorreductasa de la *Li*-TryR de los péptidos lineales **1.01-1.06** como la inhibición de la dimerización de la enzima por los péptidos lineales y truncados **1.01**, **1.03** y **1.05**. En la Tabla 1.2 se recogen los valores de concentración inhibitoria 50 (CI_{50}). La CI_{50} se define como la concentración de péptido necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la *Li*-TryR (CI_{50} act.) o la concentración necesaria para inhibir la formación de un 50% del homodímero de la enzima (CI_{50} dim.). Además de los péptidos lineales estudiados, se evaluaron el prototipo **P2** (como péptido de referencia) y dos péptidos *scrambled* (**Scb1** y **Scb2**), utilizados como controles negativos, en los que se altera de manera aleatoria el orden en la secuencia peptídica.

Tabla 1.2. Datos de evaluación biológica de los péptidos lineales y truncados **1.01-1.06**, del prototipo **P2** y de los controles negativos (**Scb1** y **Scb2**). Se recogen los valores de $CI_{50} \pm DE$ (desviación estándar) (μM).

	Péptidos	CI_{50} act. (μM)*	CI_{50} dim. (μM)*
1.01	Ac-PKIIQSVGISNleKNle-NH ₂	1.50 \pm 0.15	7.04 \pm 0.56
1.02	Ac-PKIIQSVGISNleK-NH ₂	1.28 \pm 0.08	-
1.03	Ac-PKIIQSVGISNle-NH ₂	0.91 \pm 0.10	4.62 \pm 0.26
1.04	Ac-PKIIQSVGIS-NH ₂	3.06 \pm 0.91	-
1.05	Ac-PKIIQSVGI-NH ₂	4.01 \pm 0.31	17.55 \pm 0.63
1.06	Ac-PKIIQSVG-NH ₂	> 200	-
P2 (prototipo)	Ac-PKIIQSVGISMKM-NH ₂	1.84 \pm 0.28	17.88 \pm 0.55
Scb1 (scrambled)	Ac-KMGISSMVQPKII-NH ₂	> 200	> 75
Scb2 (scrambled)	Ac-KIIPKVQGMSIMS-NH ₂	> 200	> 75

*Concentración inhibitoria necesaria para inhibir al 50% la actividad de la enzima o el 50% de la formación del homodímero. Los experimentos se realizan por triplicado.

Según se observa en la tabla anterior, el péptido **1.01**, portador de dos residuos de Nle en lugar de Met, se comporta como un potente inhibidor tanto de la actividad oxidorreductasa como del proceso de dimerización, con unos valores de CI_{50} similares o incluso ligeramente inferiores a los del prototipo **P2**. Cabe destacar la mayor estabilidad química de este péptido respecto a **P2**, no detectándose problemas de oxidación de la Met, que con el tiempo había conducido a una reducción paulatina de la actividad de las soluciones *stock* del prototipo **P2**. Por este motivo, a partir de estos resultados, el péptido **1.01** ha sido utilizado como control positivo en todos los ensayos biológicos posteriores en el laboratorio del Prof. Jiménez y como nuevo péptido prototipo en esta tesis doctoral.

En cuanto a los péptidos lineales truncados, cabe señalar que el péptido **1.03** (11-*mer*) es dos veces más activo que el prototipo **P2**. El péptido **1.05** (9-*mer*) determina la mínima longitud necesaria para la actividad, ya que la posterior eliminación del residuo de Ile9 en el péptido **1.06** (8-*mer*) se tradujo en una pérdida de la actividad. El péptido **1.05** presenta valores de CI_{50} muy similares al prototipo (**P2**) y al péptido lineal **1.01**. La falta de actividad de **1.06** sugiere la importancia del residuo de Ile9 para la actividad.

Finalmente, los péptidos *scrambled* **Scb1** y **Scb2** fueron inactivos tanto en el ensayo de actividad como en el de dimerización, lo que demostró la gran importancia del orden de los aminoácidos en la secuencia peptídica. Por tanto, la actividad de los péptidos frente a la Li-TryR es específica de la secuencia.

En base a estos resultados de actividad, para la preparación de las Series 2 y 3 de peptidomiméticos se eligieron como péptidos de referencia **1.01** (13-*mer*) y **1.05** (9-*mer*), ya que estos representaban el análogo químicamente estable del prototipo **P2** y el péptido truncado con la mínima longitud necesaria para la actividad, respectivamente.

1. 2. Péptidos cíclicos (Serie 2)

Estudios estructurales previos de dicroísmo circular y RMN mostraron que el péptido **P2** presentaba una baja estructuración helicoidal en disolución¹, lo que podría comprometer su interacción con la diana terapéutica, así como dar lugar a una mayor susceptibilidad a la degradación proteolítica.

Dentro de las distintas estrategias que se han desarrollado para la estabilización de hélices α en disolución, podemos destacar la estabilización mediante interacciones entre las cadenas laterales de los aminoácidos¹²⁻¹⁴. Las interacciones más comunes se producen entre cadenas laterales de residuos de las posiciones (i, i+3) o (i, i+4) situados a un paso de vuelta de hélice. Estas interacciones pueden ser de naturaleza no covalente o covalente. Dentro del primer tipo (interacciones de naturaleza no covalente) se han descrito interacciones de carácter polar mediante puentes salinos¹⁵⁻²⁰, interacciones π -catión^{21,22}, interacciones hidrófobas^{23,24} o de apilamiento π - π entre dos anillos de dinitrobenzo²⁵. Por otro lado, se han descrito múltiples estrategias para llevar a cabo un enlace covalente entre las cadenas laterales de dos residuos de la secuencia peptídica, colocados en la misma cara de la hélice α , intentando que los puentes covalentes se sitúen en la cara opuesta a la cara de interacción del péptido con la proteína. Caben destacar en este grupo uniones a través de interacciones metal-ligando²⁶⁻³⁰, puentes disulfuro³¹, uniones tipo lactama³²⁻³⁴ o hidrazona, y más recientemente, uniones a través de enlaces hidrocarbonados, así como la aplicación de la “química click” para la formación de 1,2,3-triazoles³⁵⁻³⁷ (Figura 1.6).

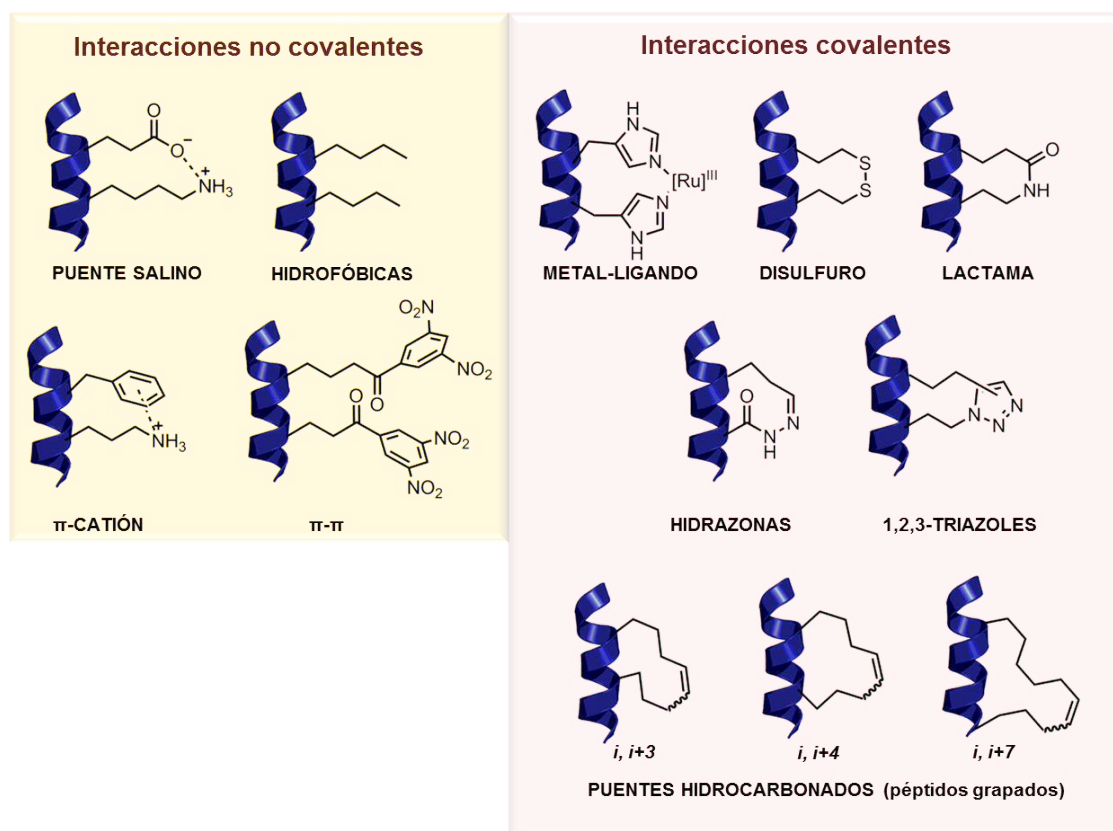


Figura 1.6. Algunas estrategias de ciclación para la estabilización de hélices α a través de interacciones entre cadenas laterales.

La restricción conformacional a través de puentes amida entre residuos de Glu/Asp y Lys de las posiciones i e $i + 3$ ($i + 4$) fue descrita por primera vez por Félix y colaboradores³⁸ y ha sido ampliamente utilizada^{32,39,40}, con éxito, en la estabilización de péptidos helicoidales en disolución, dando lugar a péptidos cíclicos con una mayor afinidad biológica por su diana y mayor estabilidad metabólica⁴¹. También se han descrito ejemplos de introducción de dos puentes amida en las posiciones i , $i + 4$ dentro de la misma secuencia que han dado lugar a una mayor estabilización de la hélice^{42,43}, así como puentes amida que unen dos vueltas de hélice, en este caso, a través de la unión de las cadenas laterales de las posiciones i , $i + 7$ ⁴⁴.

Uno de los métodos de restricción conformacional más destacables en la estabilización de hélices α ha sido la preparación de los denominados péptidos grapados en los que se introducen puentes hidrocarbonados⁴⁵. En esta estrategia se combinan dos aspectos en la estabilización de hélices, por un lado la introducción del enlace covalente entre cadenas laterales y, por otro, la metilación del carbono en α . La aproximación consiste en la introducción de α -metil- α -aquenil aminoácidos, portadores en su cadena lateral de grupos alqueno de longitud adecuada, que posteriormente a través de una reacción de metátesis dan lugar al puente hidrocarbonado (Figura 1.7). Esta metodología se ha aplicado para la estabilización de residuos tanto en posiciones (i , $i+4$) o (i , $i+7$) con el fin de unir una o dos vueltas de hélice⁴⁵.

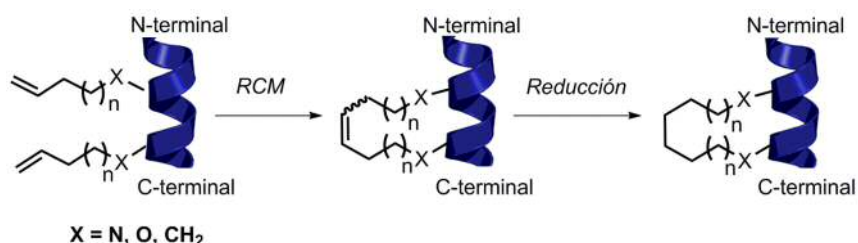


Figura 1.7. Estrategia sintética de los péptidos grapados.

Esta metodología, introducida por Blackwell y Grubbs^{46,47} a finales de los 90, ha sido estudiada en profundidad por Verdine y colaboradores⁴⁸, quienes en el año 2000 describieron de forma exitosa, y por primera vez, la estabilización de un fragmento C-terminal de la RNAsa H mediante reacción de metátesis, estudiando la importancia de la posición, la longitud del puente, así como la estereoquímica de los aminoácidos que participan en la grapa⁴⁵. Tal y como describen los autores, en todos los casos resulta crítica la longitud del cierre covalente (es decir, el número de eslabones entre los dos residuos grapados) así como la configuración absoluta de los carbonos de los residuos que participan en la grapa. Así, en las ciclaciones en las que están involucrados los

residuos de las posiciones i e $i + 3$ ($i + 4$) los mejores resultados se han obtenido con residuos no naturales de Fmoc-*S*-Ala(4'-pentenil)-OH, mientras que en las grapas que involucran residuos de las posiciones i e $i + 7$ los mejores resultados se obtienen mediante la introducción de Fmoc-*R*-Ala(7'-octenil)-OH y Fmoc-*S*-Ala(4'-pentenil)-OH, respectivamente (Figura 1.8).

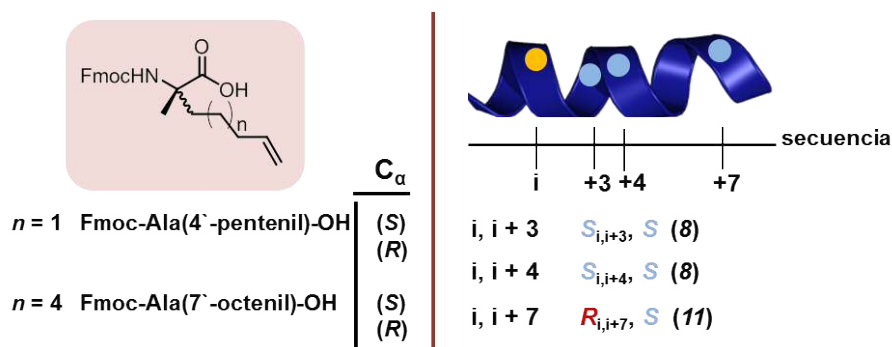


Figura 1.8. Combinaciones óptimas de los aminoácidos para la síntesis de péptidos grapados en las posiciones i , $i+3$ ⁴⁹, i , $i+4$ ⁵⁰, i , $i+7$ ⁴⁸, tal y como está descrito en la bibliografía. Además, se muestra la nomenclatura original empleada por Verdine y colaboradores⁴⁸ para los aminoácidos: en mayúsculas se indica la configuración absoluta de los C_α de los residuos; la posición de ciclación en la secuencia peptídica se muestra como subíndice y entre paréntesis el número de eslabones que forman parte del cierre covalente.

Los péptidos grapados han mostrado un aumento de helicidad, una mejor estabilidad proteolítica y en muchos casos una permeabilidad celular superior en comparación con los correspondientes péptidos lineales precursores.⁵⁰⁻⁵⁶

El potencial de la reacción de metátesis, y la elevada tolerancia de la mayoría de los grupos funcionales a los catalizadores desarrollados para esta reacción, junto con la mejora de las propiedades farmacocinéticas de los péptidos grapados, han hecho que esta tecnología haya sido ampliamente utilizada para la estabilización de hélices α en la búsqueda de inhibidores de interacciones proteína-proteína.^{13,57}

En este trabajo nos hemos centrado en la preparación de péptidos cíclicos en los que se introduce un puente amida CONH o un puente hidrocarbonado (péptidos grapados) entre las cadenas laterales de dos residuos i , $i + 4$ separados un paso de vuelta de hélice.

1.2.1. Diseño de los péptidos cíclicos

Para el diseño de los péptidos cíclicos más adecuados, en primer lugar, se evaluaron todas las posibles posiciones para el cierre covalente mediante un puente amida (a través de los residuos de Glu y Lys) en el péptido **1.01**, un análogo del

prototipo **P2**, que como hemos visto mostraba una actividad similar y una mayor estabilidad química. Para el cierre covalente se eligieron residuos en posiciones $i, i + 4$ que estuvieran situados en la cara de no interacción con la enzima. En la Figura 1.9 se representa la proyección helicoidal del péptido **1.01** (13-*mer*) sobre la superficie de interacción de la TryR mostrándose las distintas posibilidades de cierre (a-d) que darían lugar a los péptidos **1.09-1.12** tras la etapa de ciclación. Las posibilidades que no se especifican situarían la ciclación entre residuos dispuestos en la zona de interacción con la TryR y serían, a priori, contraproducentes en su efecto inhibitorio.

Como se ha comentado en los resultados de actividad biológica de los péptidos truncados, el péptido lineal truncado **1.05** (9-*mer*) representa la mínima longitud necesaria para la actividad, por lo que siguiendo esta misma estrategia también se diseñaron los péptidos cíclicos **1.13** y **1.14**, derivados de dicho péptido truncado (Figura 1.9).

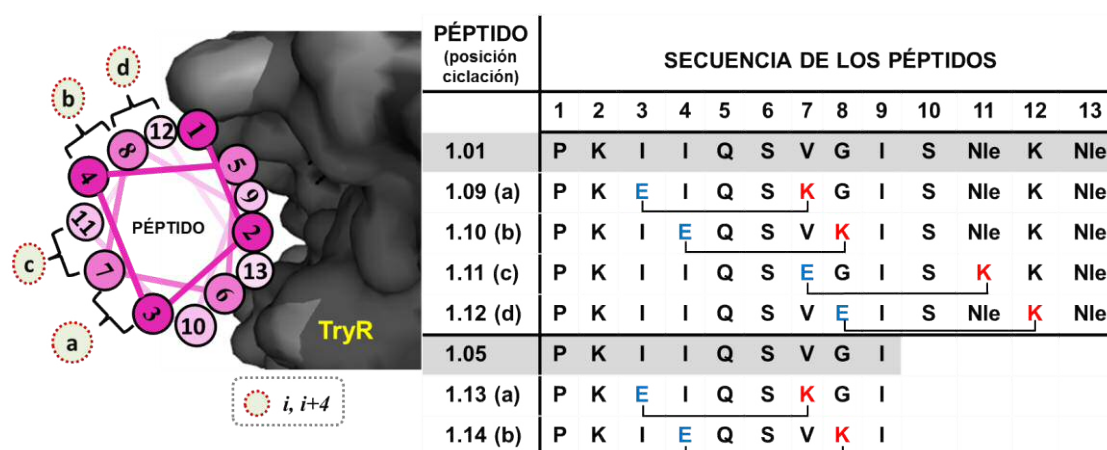


Figura 1.9. Proyección helicoidal del péptido **1.01** sobre la superficie de interacción de TryR, donde se muestran las distintas posibilidades de cierre (a-d) a través de puentes amida. En la tabla se indica la secuencia de los péptidos cíclicos propuestos (**1.09-1.14**) y de los péptidos lineales **1.01** y **1.05**.

Una vez definidas las mejores posiciones de ciclación para la actividad en la serie de péptidos cíclicos a través de puentes amida de mayor accesibilidad sintética, se prepararán los correspondientes péptidos grapados utilizando estas mismas posiciones óptimas de ciclación.

1.2.2. Síntesis de los péptidos cíclicos

En la síntesis de los péptidos objetivo con puentes amida se aislaron tanto los péptidos cíclicos **1.09-1.14** (13-*mer* y 9-*mer*) como sus correspondientes precursores lineales **1.15-1.20** portadores de residuos de Glu y Lys sin ciclar (Figura 1.10).

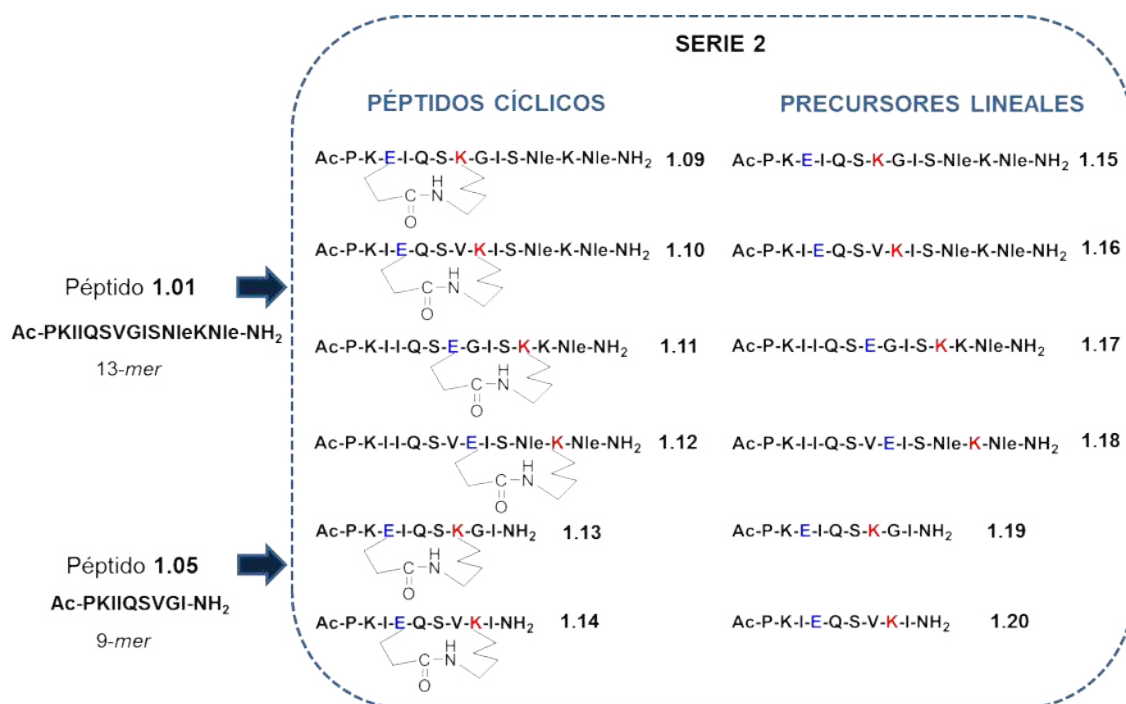
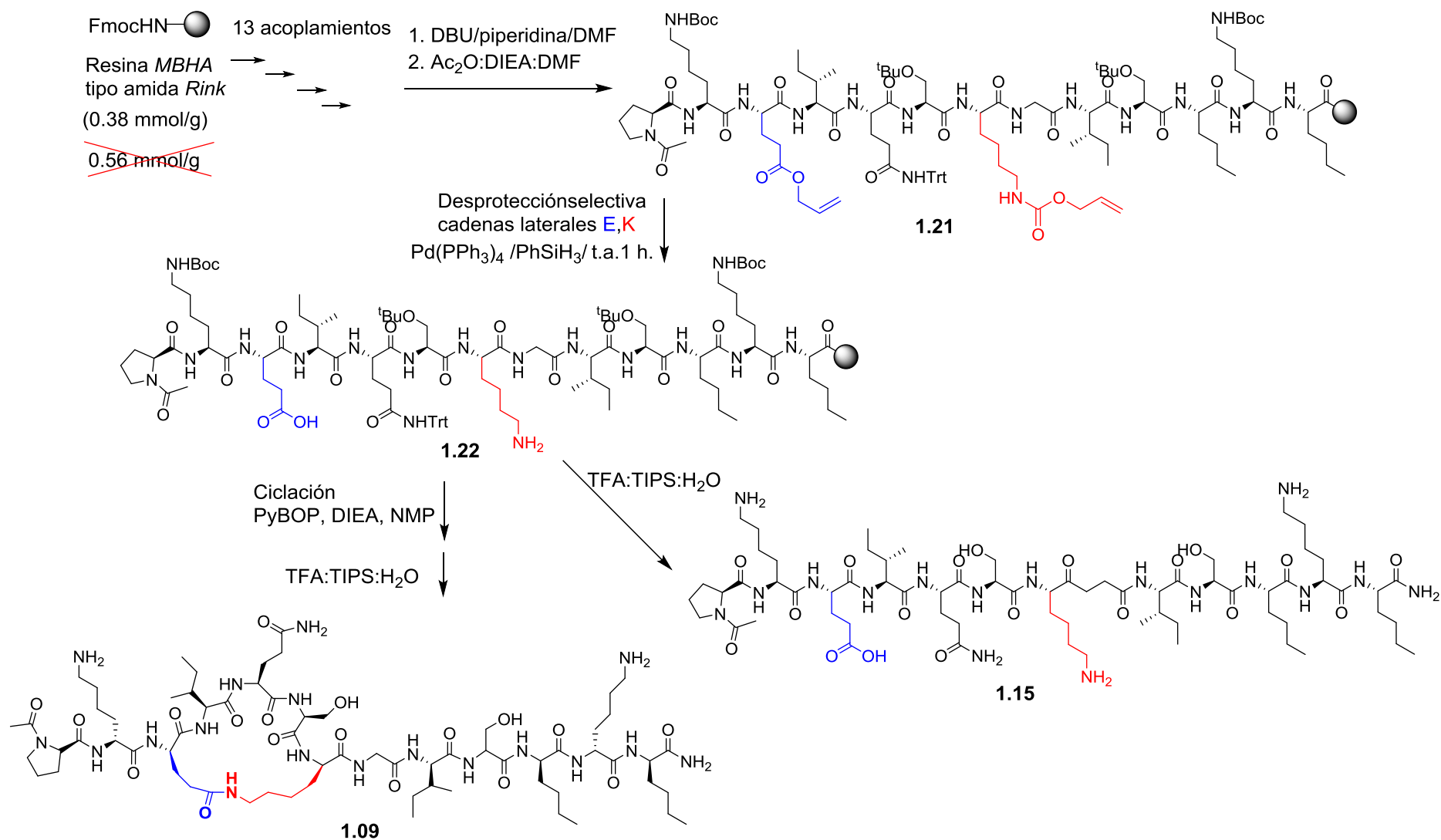


Figura 1.10. Péptidos cíclicos con puente amida (1.09-1.14) y sus precursores lineales (1.15-1.20).

La síntesis de los péptidos cíclicos objetivo **1.09-1.14** consistió, en primer lugar, en la obtención de sus precursores lineales anclados a la resina mediante la metodología estándar de síntesis de péptidos en fase sólida mencionada anteriormente (apartado 1.1.1), empleando una resina *MBHA* de tipo amida *Rink* de carga 0.56 mmol/g con los aminoácidos apropiados y HCTU como agente de acoplamiento. Las cadenas laterales de los aminoácidos fueron protegidas como tritilcarbamoil derivados (Gln), como éster *tert* butílico (Glu), como carbamato *tert* butílico (Lys) o como éter butílico (Ser). Las cadenas laterales de **Glu** y **Lys** fueron protegidas de manera ortogonal con los grupos protectores aliloxicarbonilo (Alloc) y alilo (OAl), respectivamente. Para su desprotección selectiva se empleó una disolución de Pd(PPh₃)₄ y PhSiH₃ en la mínima cantidad de DCM anhidro, agitada a temperatura ambiente durante 1 hora.⁵⁸

A continuación, se llevó a cabo la ciclación intramolecular con el fin de obtener los péptidos cíclicos **1.09-1.14**. En base a precedentes bibliográficos se decidió realizar la ciclación en fase sólida, y no en disolución, para aprovechar las condiciones de alta dilución inherentes al uso de resinas, y así minimizar los procesos no deseados de reacciones intermoleculares que darían lugar a la formación de oligómeros.

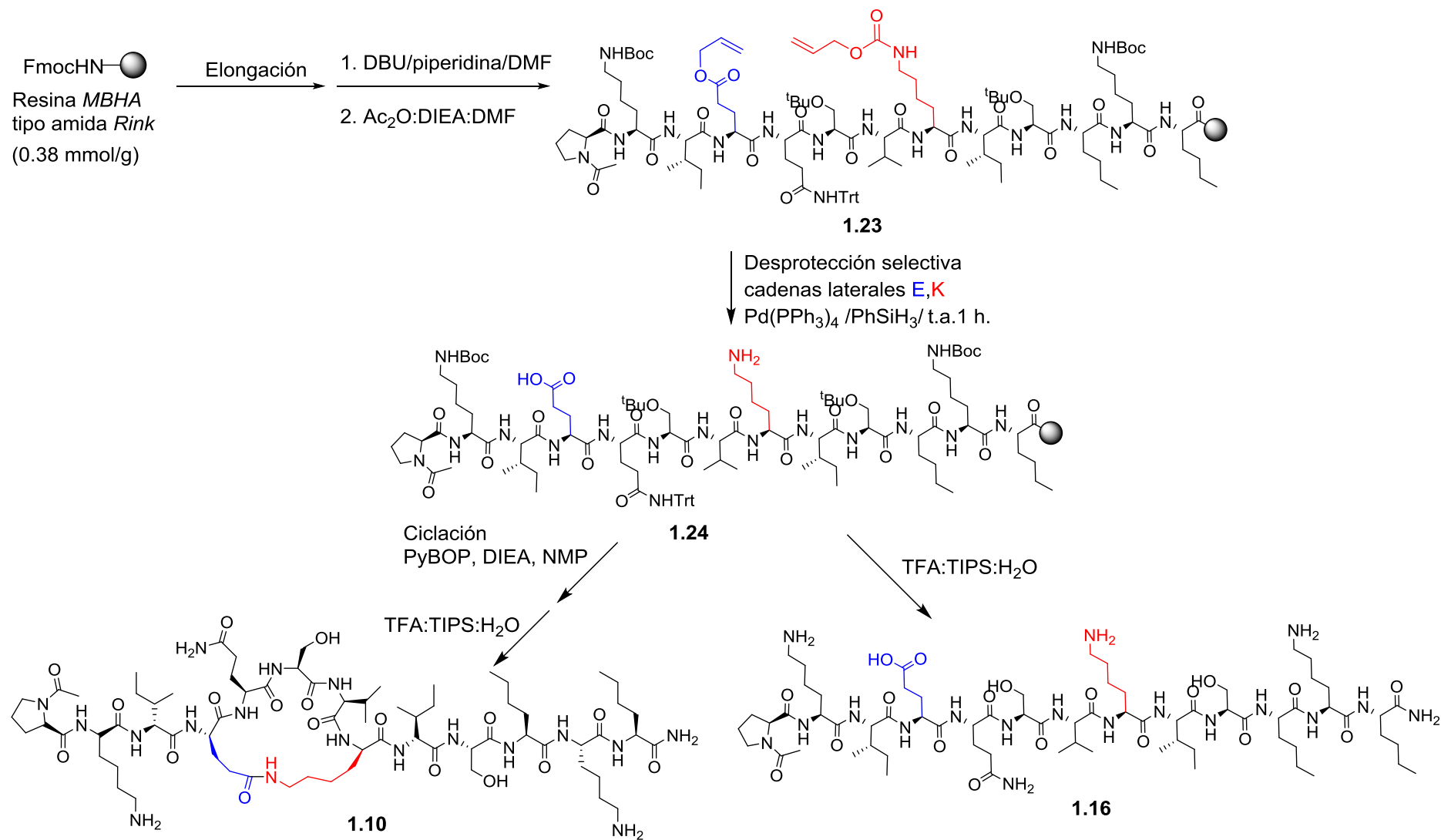
A modo de ejemplo, seguidamente se detalla la síntesis del péptido cíclico **1.09** (Esquema 1.3). Los ensayos iniciales de ciclación se realizaron sobre la peptidil-resina



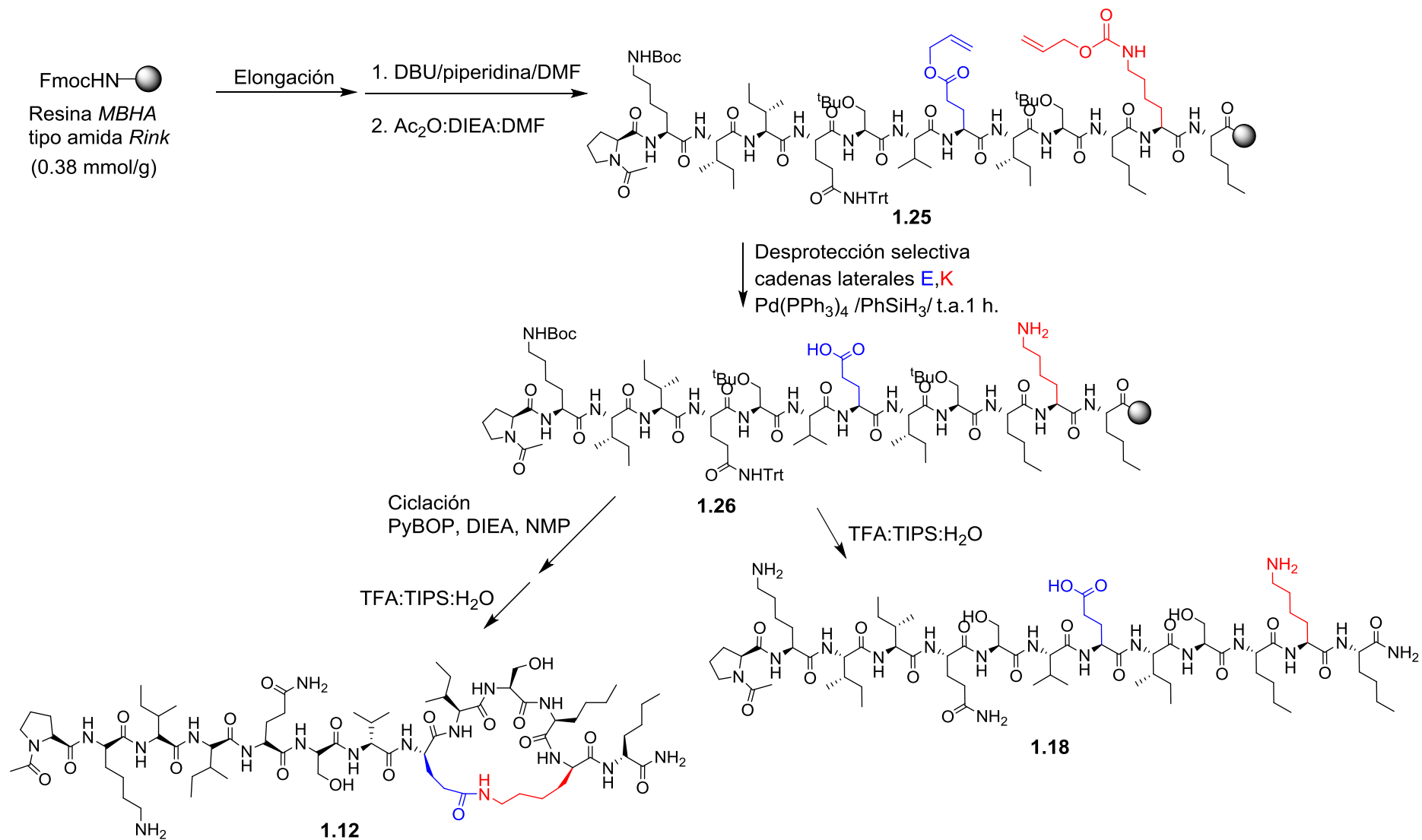
Esquema 1.3. Síntesis del péptido cíclico 1.09 y de su precursor lineal 1.15.

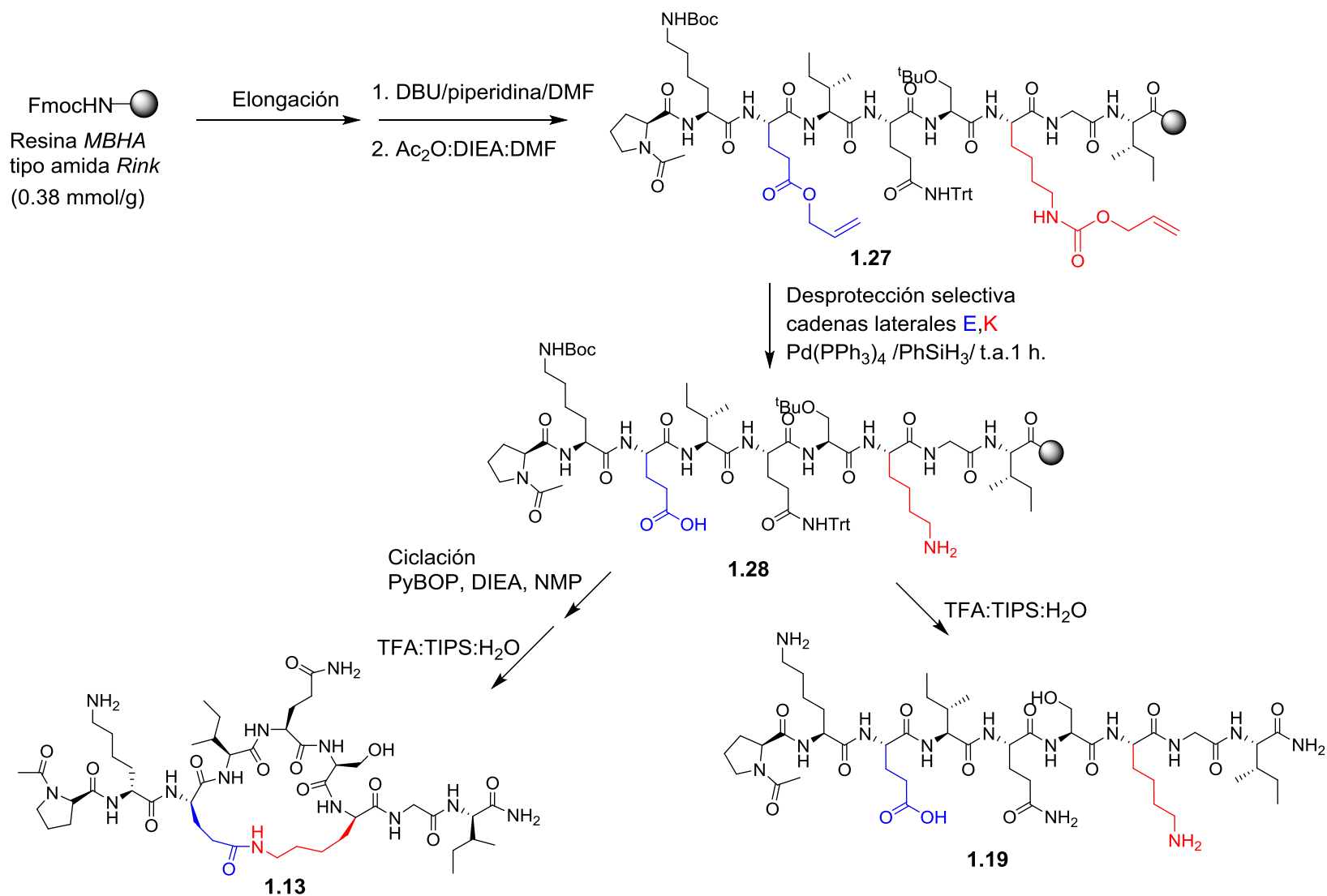
precursora, protegida en el extremo *N*-terminal con un grupo Fmoc, con el fin de facilitar el seguimiento de la reacción por HPLC-MS (254 nm). Sin embargo, estos experimentos iniciales, empleando distintos agentes de acoplamiento tales como PyBOP, PyAOP o HATU en presencia de DIEA como base, condujeron a mezclas de productos en los que se detectaba la pérdida de grupo Fmoc. Se decidió entonces llevar a cabo la ciclación en la peptidil-resina acetilada en el extremo *N*-terminal. En este caso la monitorización de la reacción por HPLC-MS se llevó a cabo a 214 nm. Todos los intentos de ciclación en el precursor acetilado en presencia de distintos agentes de acoplamiento, distintas temperaturas y utilizando radiación por microondas fueron infructuosos no observándose en ningún caso (HPLC-MS) la formación del producto ciclado. En la síntesis de los péptidos lineales precursores se había utilizado una resina *MBHA* tipo amida *Rink* con una carga de 0.56 mmol/g, que había funcionado con éxito. Sin embargo, esta resina no funcionó en la reacción de ciclación. Con el fin de favorecer la ciclación, se decidió utilizar una resina de menor carga (0.38 mmol/g). Así, se repitieron las etapas de elongación, acetilación (peptidil-resina **1.21**) y desprotección selectiva de las cadenas laterales de Lys y Glu (peptidil-resina **1.22**) (Esquema 1.3). El tratamiento de la nueva peptidil-resina con 3 equivalentes de PyBOP como agente de acoplamiento, 6 equivalentes de DIEA como base y NMP como disolvente (3 volúmenes respecto a la resina) a temperatura ambiente durante una hora⁵⁹, condujo a la formación del producto cíclico deseado, tal y como se observó por HPLC-MS, tras el desanclaje de una pequeña parte de la peptidil-resina. Finalmente, tras el proceso de ciclación mencionado se realizó el desanclaje, sedimentación y purificación del residuo obtenido por HPLC-semipreparativo, lo que permitió acceder al péptido objetivo deseado **1.09** en un 12% de rendimiento global y con una pureza superior al 95%. El precursor lineal **1.15**, que también fue aislado, se obtuvo con un rendimiento global del 6% y una pureza superior al 97% tras purificación cromatográfica (Esquema 1.3).

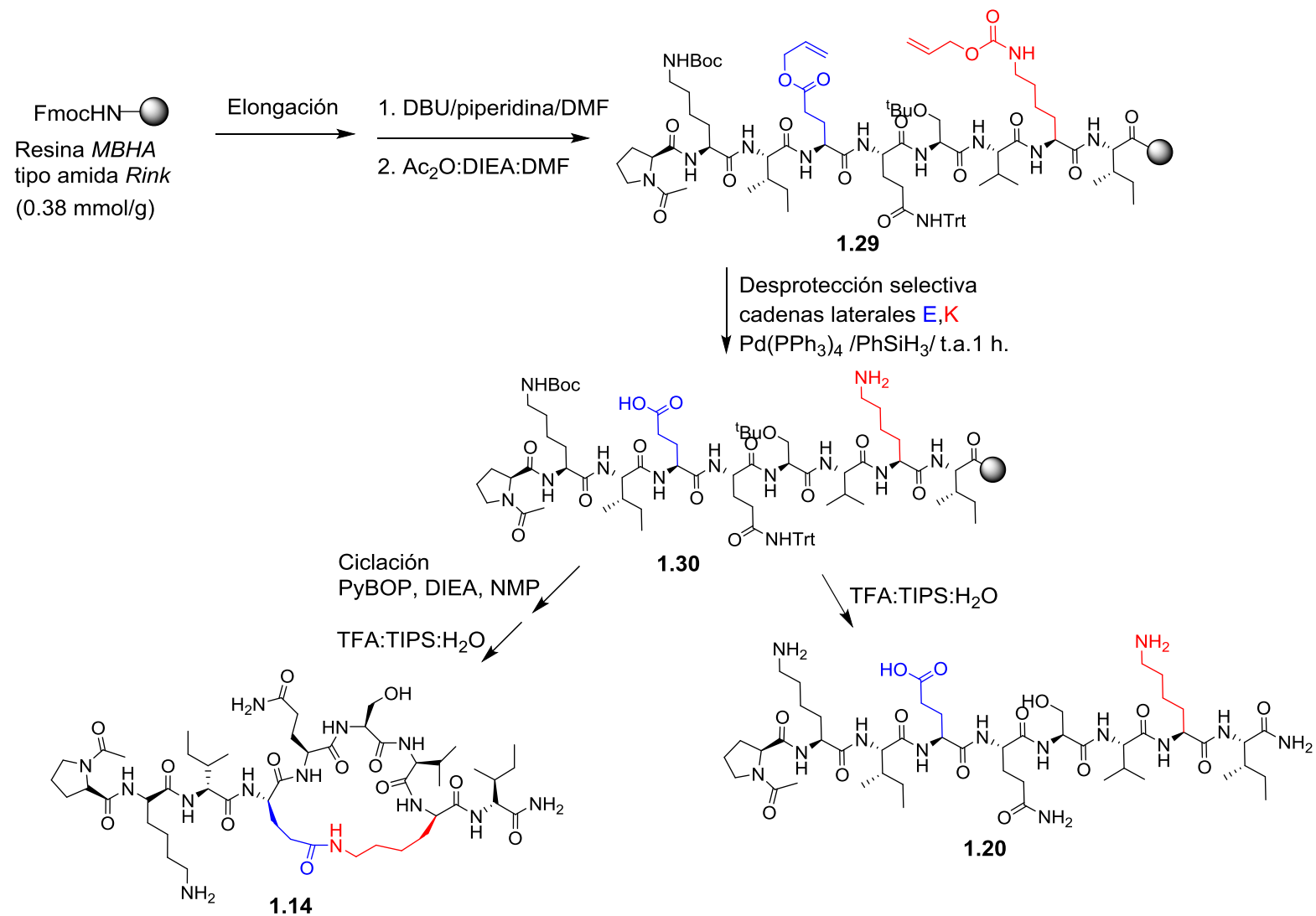
De manera similar, se prepararon los péptidos cíclicos objetivo de 13-mer **1.10** y **1.12** así como sus precursores lineales **1.16** y **1.18** con rendimientos globales comprendidos entre 1-21% y purezas superiores al 95% (Esquemas 1.4 y 1.5). Asimismo, se aislaron los péptidos cíclicos de 9-mer **1.13** y **1.14** y sus precursores lineales **1.19** y **1.20** con rendimientos globales comprendidos entre el 2-24% y purezas superiores al 95% (Esquemas 1.6 y 1.7). Sus datos analíticos y rendimientos globales se recogen más adelante en la Tabla 1.3.



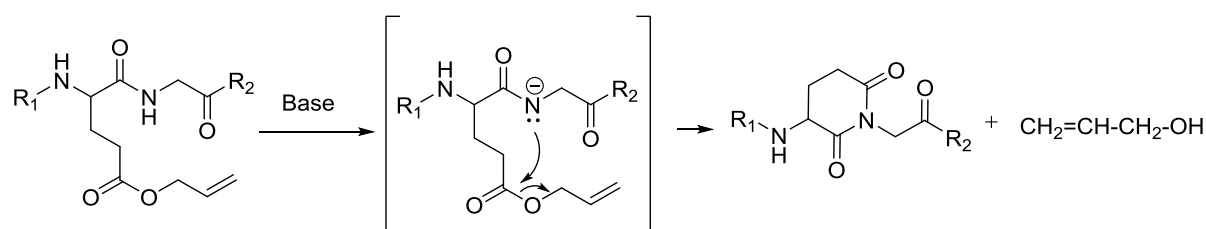
Esquema 1.4. Síntesis del péptido cíclico de 13-mer **1.10** y de su precursor lineal **1.16**.

Esquema 1.5. Síntesis del péptido cíclico de 13-mer **1.12** y de su precursor lineal **1.18**.

Esquema 1.6. Síntesis del péptido cíclico de 9-mer **1.13** y su análogo lineal **1.19**.

Esquema 1.7. Síntesis del péptido cíclico de 9-mer **1.14** y su análogo lineal **1.20**.

Sin embargo, siguiendo una estrategia similar no se pudo obtener el péptido cíclico **1.11**, portador de un residuo de Gly adyacente a un Glu protegido con el grupo alilo. Está descrito en la bibliografía⁶⁰ que en este tipo de secuencias se produce la formación de glutarimida (Esquema 1.8) por ciclación intramolecular en el medio básico de la reacción.



Esquema 1.8. Reacción de formación de glutarimida en medio básico.

Un análisis más detallado del HPLC-MS en la etapa de elongación tras la introducción del residuo de Ser nos permitió detectar la formación de glutarimida (Figura 1.11).

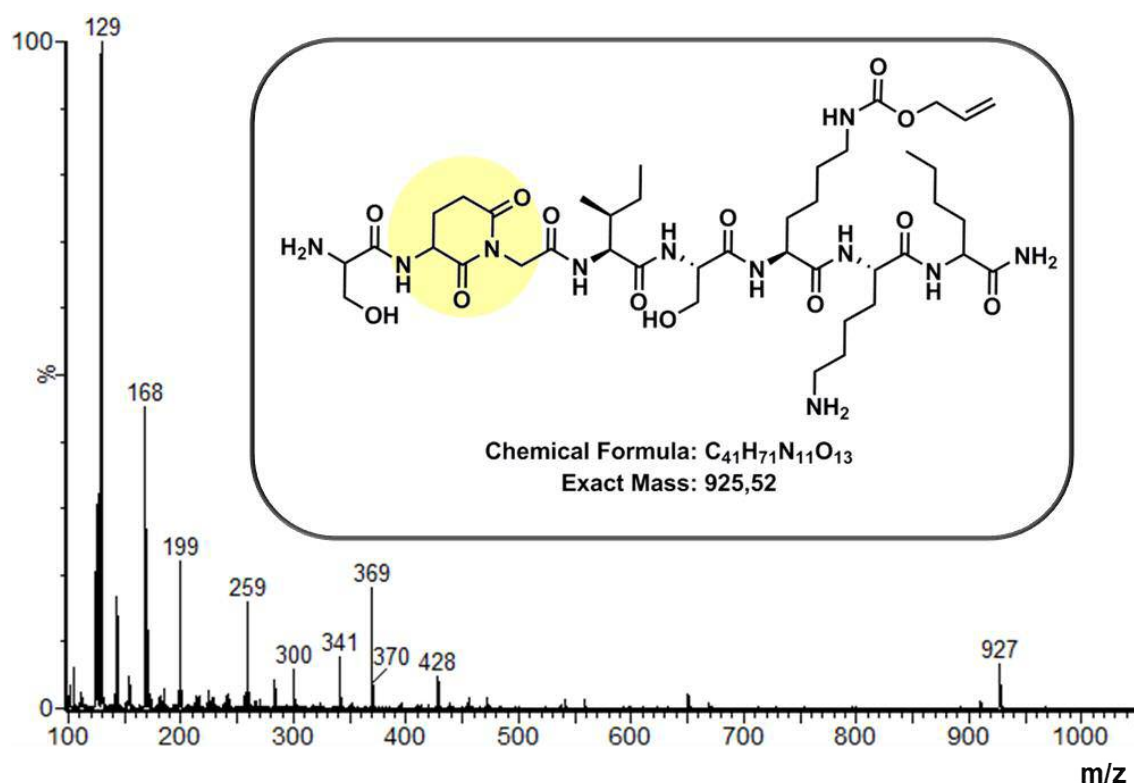
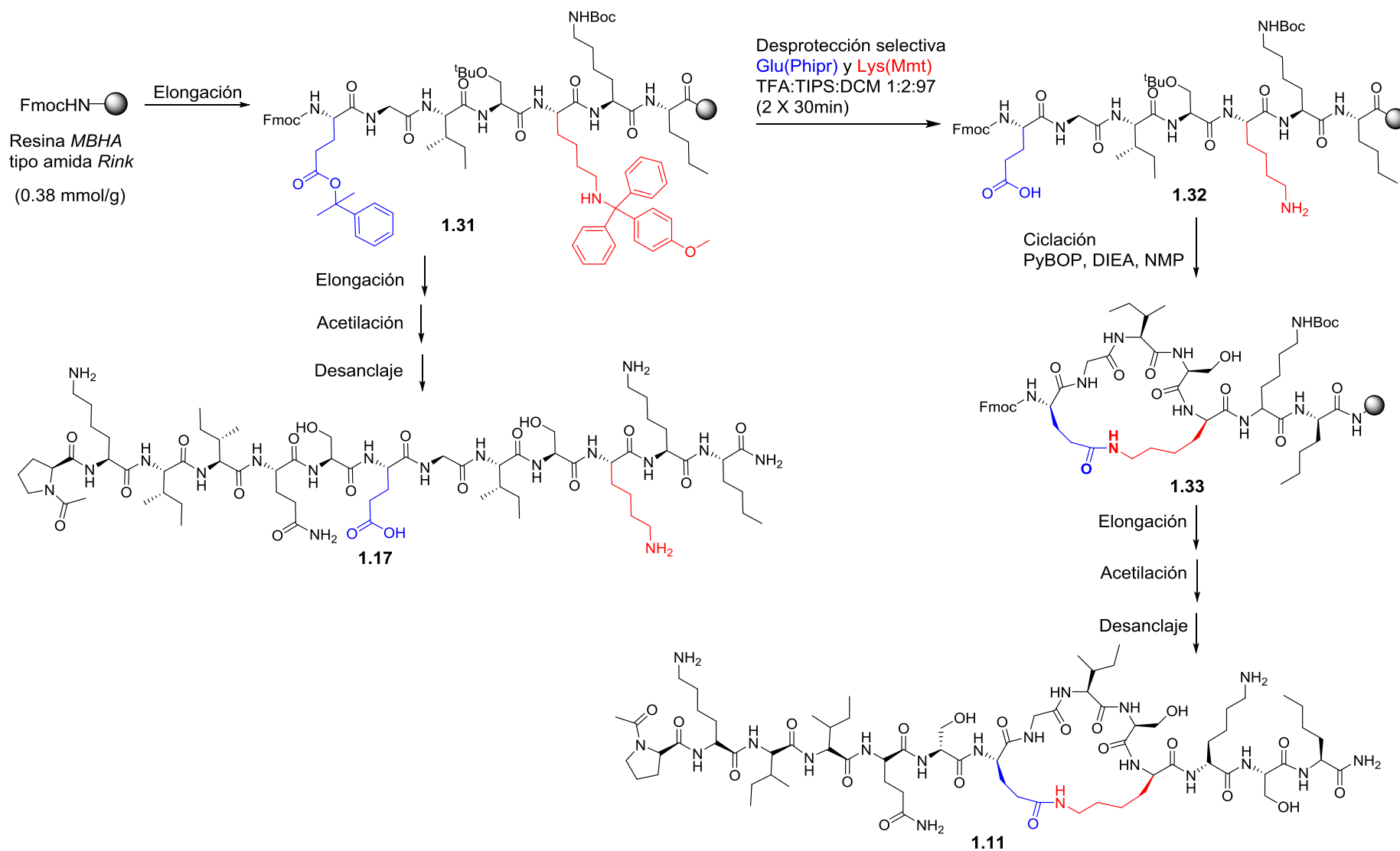


Figura 1.11. HPLC-MS donde se ve la formación de glutarimida en un intermedio del péptido **1.11**.



Esquema 1.9. Síntesis del péptido cíclico **1.11** y de su precursor lineal **1.17**.

Con el fin de evitar la formación de la glutarimida, como estrategia alternativa se protegieron las cadenas laterales de los residuos de **Lys** y **Glu** selectivamente con dos grupos más voluminosos para aumentar el impedimento estérico, y evitar así, que se produjese la ciclación indeseada. Se emplearon los grupos protectores fenilisopropilo (**Phipr**) y monometoxitritilo (**Mmt**) para proteger el **Glu** y la **Lys** respectivamente. Estos grupos protectores se desprotegen en un medio ácido de TFA diluido al 1%. La diferente proporción de TFA empleado para la desprotección de estas cadenas (1%) y para el desanclaje de la cadena peptídica de la resina (95%) permitió realizar la desprotección del **Glu** y **Lys** de manera ortogonal. La síntesis del péptido **1.11** y de su precursor lineal **1.17** se detalla en el Esquema 1.9. En el caso del péptido cíclico **1.11** se realizó la desprotección selectiva de las cadenas laterales de **Glu** y **Lys** (peptidil-resina **1.32**) e inmediatamente después se cicló empleando PyBOP como agente de acoplamiento y DIEA como base (**1.33**). A continuación, se completó la elongación del péptido y se llevó a cabo el desanclaje de la resina poliestirénica en condiciones estándar.

La síntesis del precursor lineal **1.17** se llevó a cabo tras completar la elongación, a partir de la peptidil resina **1.31**, acetilación y desanclaje en condiciones estándar de TFA que condujo a la desprotección simultánea de las cadenas laterales de **Glu** y **Lys**.

Tras la purificación de ambos productos en un equipo de cromatografía de media presión de Biotage®, se obtuvo el péptido cíclico **1.11** y su precursor lineal **1.17** en rendimientos del 18% y 8% y purezas superiores al 99% y 98%, respectivamente.

En la Tabla 1.3 se recogen, a modo de resumen, todos los datos analíticos y rendimientos globales de todos los péptidos cíclicos con puente amida (**1.09-1.14**) y de sus precursores lineales (**1.15-1.20**).

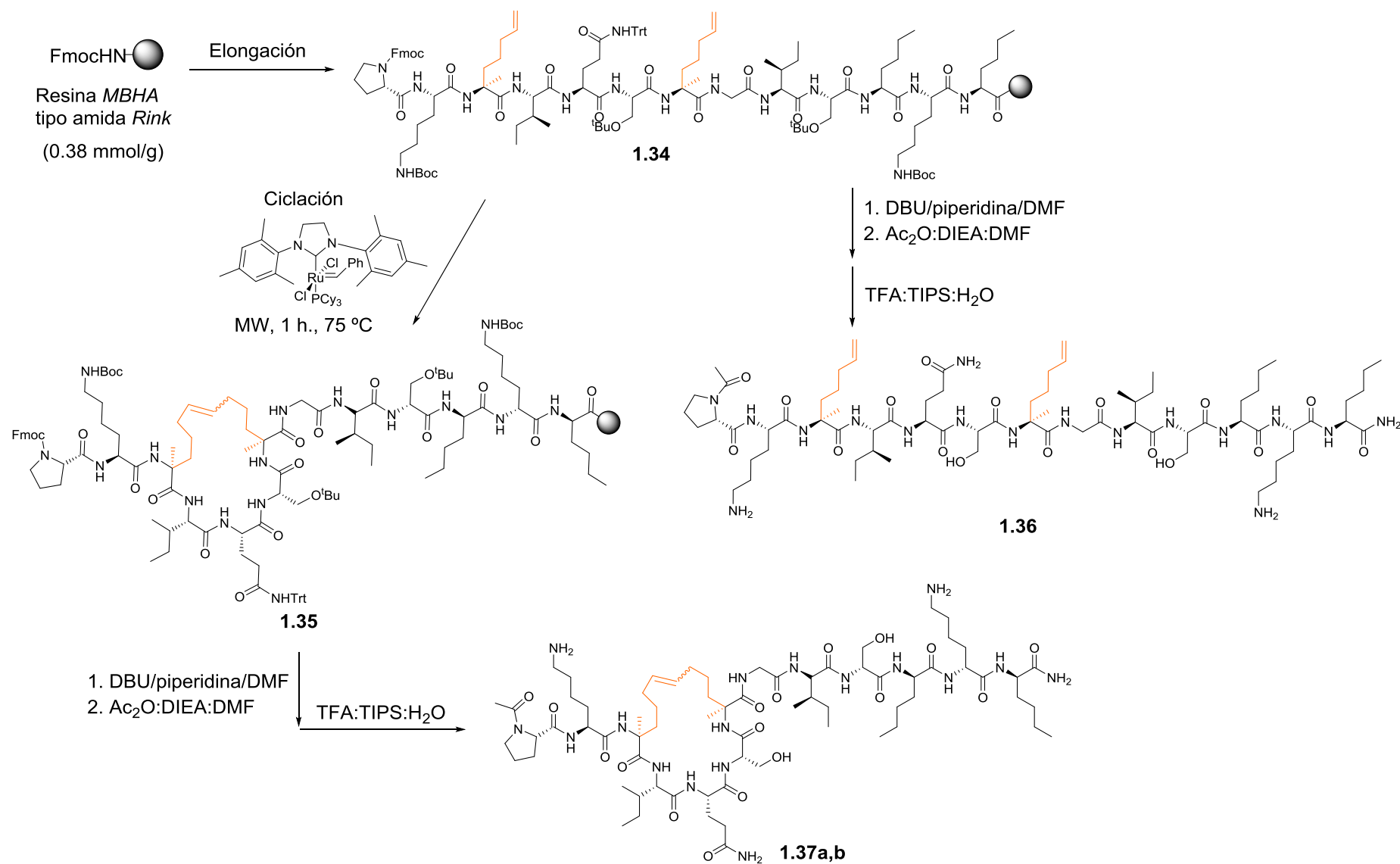
Tabla 1.3. Datos analíticos y rendimientos globales de los péptidos cíclicos con enlace amida y de sus precursores lineales.

	Péptido	Fórmula molecular	Masa exacta calc.	m/z obs.	t _R [*] (min)	Pureza [*] (%)	Rto global (%)
PÉPTIDOS CÍCLICOS AMIDA	1.09	C ₆₇ H ₁₁₈ N ₁₈ O ₁₈	1462.8934	1462.8871	6.64	>95	12
	1.10	C ₇₀ H ₁₂₄ N ₁₈ O ₁₈	1504.9352	1504.9341	8.79	>99	13
	1.11	C ₆₇ H ₁₁₈ N ₁₈ O ₁₈	1462.8880	1462.8871	7.30	>99	18
	1.12	C ₇₀ H ₁₂₃ N ₁₇ O ₁₈	1489.9234	1489.9232	10.72	>97	1
	1.13	C ₄₆ H ₇₉ N ₁₃ O ₁₃	1021.5936	1021.5920	11.94	>96	16
	1.14	C ₄₉ H ₈₅ N ₁₃ O ₁₃	1063.6397	1063.6390	6.13	>95	24
PRECURSORES LINEALES	1.15	C ₆₇ H ₁₂₀ N ₁₈ O ₁₉	1480.8986	1080.8977	7.01	>97	6
	1.16	C ₇₀ H ₁₂₆ N ₁₈ O ₁₉	1506.9461	1506.9497	7.43	>99	21
	1.17	C ₆₇ H ₁₂₀ N ₁₈ O ₁₉	1480.8980	1480.8977	5.57	>98	8
	1.18	C ₇₀ H ₁₂₅ N ₁₇ O ₁₉	1507.9360	1507.9338	9.48	>95	7
	1.19	C ₄₆ H ₈₁ N ₁₃ O ₁₄	1039.6038	1039.6026	8.72	>92	2
	1.20	C ₄₉ H ₈₇ N ₁₃ O ₁₄	1081.6510	1081.6495	12.08	>96	6

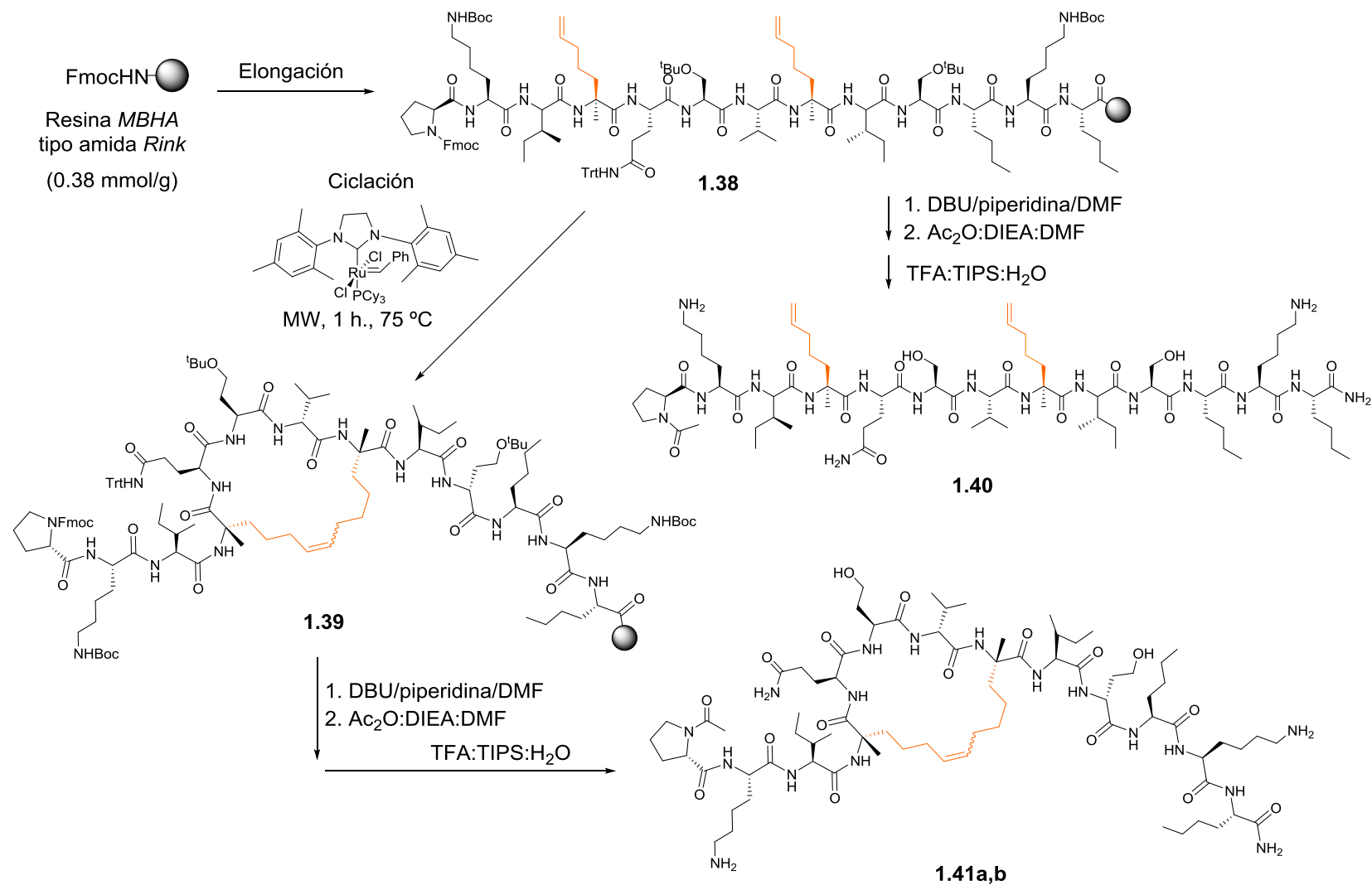
^{*} Medido en HPLC analítico a 214 nm utilizando el gradiente 1 descrito en la parte experimental.

Como se verá posteriormente, los mejores resultados de actividad biológica se obtuvieron para los péptidos cíclicos **1.09** y **1.10** (13-*mer*). Estos péptidos poseen un enlace amida entre las posiciones 3/7 y 4/8, respectivamente, de la cadena peptídica, por lo que se decidió sintetizar los péptidos grapados (con un puente hidrocarbonado) con la misma longitud y en las mismas posiciones de ciclación.

La síntesis de los péptidos grapados (Esquemas 1.10 y 1.11) se llevó a cabo en una resina *MBHA* de tipo amida *Rink* de baja carga (0.38 mmol/g). La síntesis comenzó con la elongación de la cadena peptídica, introduciendo en las posiciones 3 y 7 ó 4 y 8, según corresponda, el aminoácido modificado Fmoc-S-Ala(4'-pentenil)-OH obtenido de fuentes comerciales, ya que como se ha comentado éste es el residuo que da mejores resultados en la ciclación cuando están involucrados residuos i e i+4 de la secuencia peptídica.



Esquema 1.10. Síntesis de los péptidos grapados **1.37a,b** y de su precursor lineal **1.36**.



Esquema 1.11. Síntesis de los péptidos grapados **1.41a,b** y de su precursor lineal **1.40**.

En el Esquema 1.10 se muestra la síntesis para el péptido grapado en las posiciones 3 y 7 (**1.37**) y el precursor lineal **1.36** que también fue aislado. Así, se puede observar cómo una vez completada la elongación del péptido se obtuvo la peptidil-resina **1.34** protegida en su forma Fmoc. A continuación, se dividió la resina en dos partes, obteniéndose, con una parte de la resina, el péptido lineal precursor **1.36** (9% de rendimiento global), tras acetilación y desanclaje, y con la otra parte, se llevó a cabo la ciclación. Para ello, se empleó una reacción de metátesis, en la que se utilizó el catalizador de Grubbs de segunda generación (0.2 equivalentes), un 10% en volumen de una disolución de LiCl 4.0 M en DMF, que se utilizó como agente caotrópico⁶¹ y DCM como disolvente. Esta reacción se llevó a cabo en el microondas a 75 °C durante una hora⁶², obteniéndose la peptidil-resina **1.35** en la que se detectó la formación de dos especies con el mismo peso molecular (HPLC-MS) atribuibles, como era de esperar, a una mezcla de isómeros *E/Z* en proporciones 1:6 (Figura 1.12), obtenidas tras el desanclaje de una pequeña parte de la resina. Tras desprotección del grupo Fmoc, acetilación y desanclaje se realizó la purificación del crudo obtenido mediante HPLC-semipreparativo, obteniéndose los péptidos **1.37a** (isómero minoritario) y **1.37b** (isómero mayoritario) con rendimientos del 1% y del 4%, respectivamente, y purezas superiores al 96%.

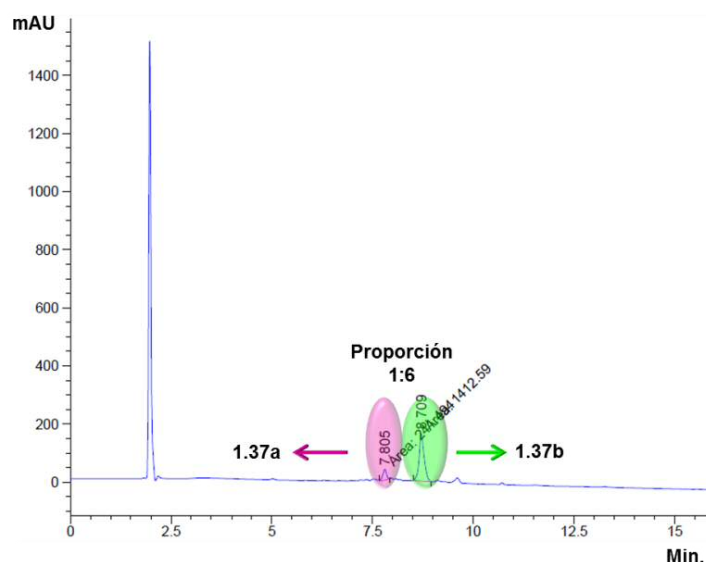


Figura 1.12. Cromatograma del crudo obtenido en la reacción de metátesis, donde se pueden apreciar los isómeros *E/Z* formados en una proporción 1:6.

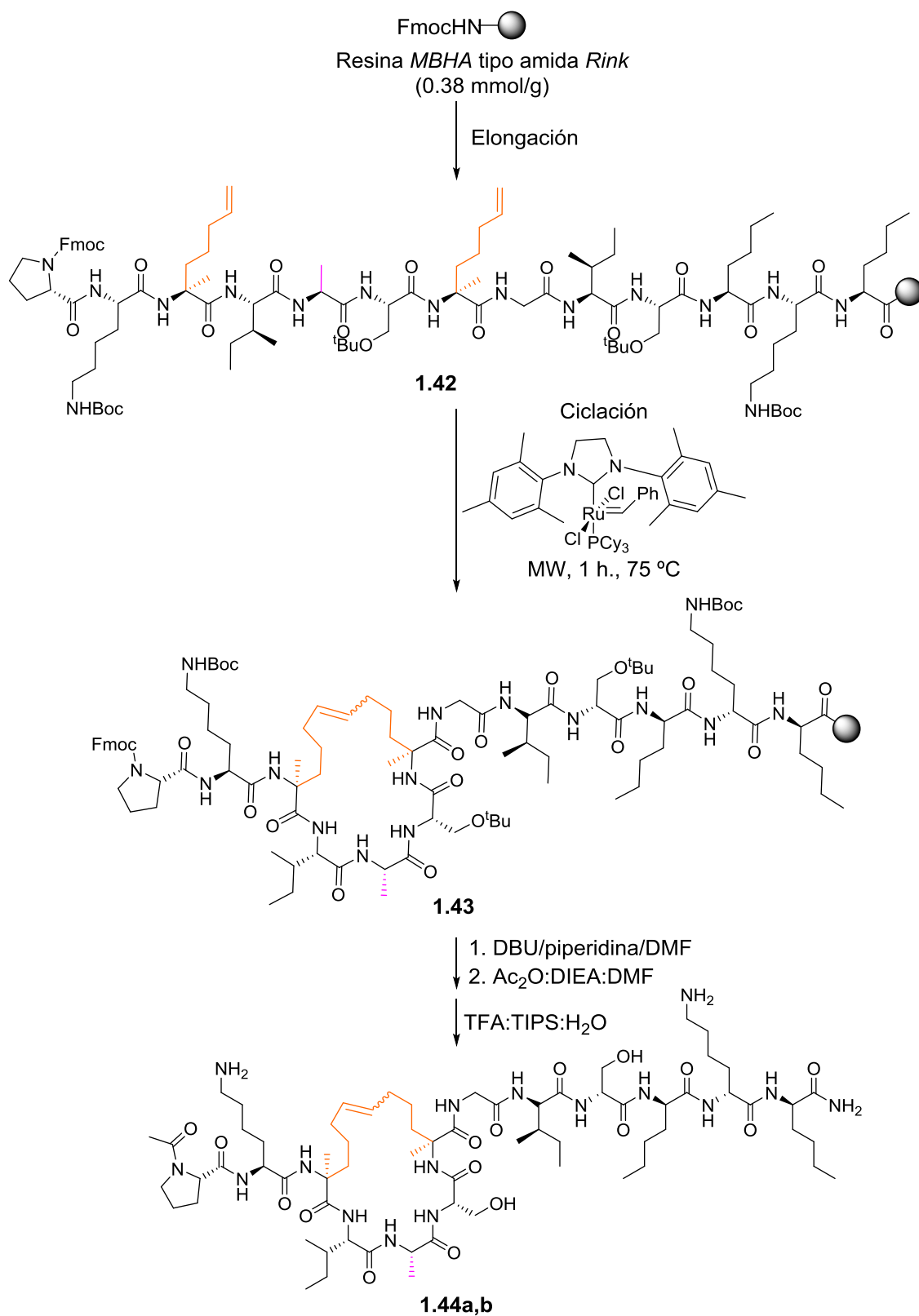
Con el fin de identificar los isómeros *E* y *Z* se llevó a cabo la caracterización de los compuestos **1.37a,b** por RMN en colaboración con la Dra. M. Ángeles Jiménez del Instituto de Química-Física Rocasolano (IQFR-CSIC).

Para determinar el valor de la constante de acoplamiento (J) y determinar así de qué isómero se trata, en los péptidos grapados hay que identificar los desplazamientos químicos (δ) de los protones de la posición ϵ y ϵ' ($\delta_{H\epsilon}$ y $\delta_{H\epsilon'}$). La asignación de estos protones mostró valores idénticos de $\delta_{H\epsilon}$ y $\delta_{H\epsilon'}$ tanto en el caso del péptido **1.37a** (5.36 ppm) como de **1.37b** (5.46 ppm), como se puede ver en la tabla de desplazamientos químicos de 1H recogida en la parte experimental de esta memoria. El hecho de que los protones de la posición ϵ y ϵ' tengan desplazamientos químicos iguales impide poder medir la constante de acoplamiento (J) y, en consecuencia, poder determinar de manera inequívoca cuál es el isómero *E* o *Z* en ninguno de los dos péptidos.

Siguiendo una metodología similar a la utilizada para los péptidos **1.37a,b** se llevó a cabo la síntesis del péptido **1.41**, con un puente hidrocarbonado entre las posiciones 4 y 8, y de su correspondiente precursor lineal **1.40** (Esquema 1.11). Una vez completada la elongación para dar lugar a la peptidil-resina **1.38** protegida en su forma Fmoc, tras acetilación, desanclaje y purificación del crudo final por HPLC semipreparativo se obtuvo el precursor lineal **1.39** en un 5% de rendimiento. Asimismo, el tratamiento de la peptidil-resina **1.38** en las condiciones de metátesis anteriormente mencionadas condujo, tras acetilación y desanclaje, a un crudo de reacción correspondiente al péptido grapado **1.41**. En este caso, el HPLC-MS del crudo de reacción permitió identificar la presencia de los dos isómeros *E/Z* de igual masa molecular pero no fue posible determinar la proporción de cada uno de los isómeros, ya que se obtuvo un cromatograma muy sucio con picos anchos y poco resueltos. La purificación del crudo de reacción por HPLC-semipreparativo permitió aislar únicamente el isómero mayoritario de **1.41** (**1.41b**) con elevada pureza aunque en un bajo rendimiento global (2%). Con el fin de determinar nuevamente si se trataba del isómero *E* o *Z* se realizaron estudios de RMN encaminados a la determinación de la constante de acoplamiento (J). A diferencia de los péptidos **1.37a** y **1.38**, en el péptido **1.41b** los protones vinílicos ϵ y ϵ' presentaron desplazamientos químicos diferentes (5.38 y 5.47 ppm, respectivamente), lo que permitió la medida de la J entre ellos. A 35 °C la J entre los dos protones vinílicos del isómero **1.41b** mostró un valor aproximado de 18.6-19.0 Hz, lo que indica que se trata del isómero *E*. El hecho de que el producto mayoritario de la reacción de metátesis sea el isómero *E* ya había sido observado en unos péptidos grapados análogos obtenidos en estudios previos a esta Tesis Doctoral.⁶³

Como se comentará más adelante en el apartado correspondiente a los resultados de actividad biológica, los isómeros mayoritarios de los péptidos grapados **1.37** (**1.37b**) y **1.41** (**1.41b**) a través de las posiciones 3/7 y 4/8 presentaron un comportamiento inesperado no observado hasta la fecha en los ensayos enzimáticos de dimerización, comportándose como estabilizadores del homodímero en lugar de inhibidores. Para estudiar si estos péptidos grapados interaccionaban en la interfaz de dimerización de manera similar a la propuesta para el péptido lineal prototipo, y descartar que la introducción de la grapa carbono-carbono pudiera dar lugar a una interacción diferente con la enzima, decidimos sintetizar un péptido grapado en las posiciones 3 y 7 (análogo de **1.37b**) en el que se sustituyó el residuo de Gln 5 por Ala eliminando así la cadena lateral de uno de los residuos más importantes para la interacción en la interfaz. Para ello nos basamos en estudios previos realizados con el péptido lineal **P3** (Ac-Pro-Lys-Ile-Ile-**Ala**-Ser-Val-Gly-Ile-Ser-Nle-Lys-Nle-NH₂), que presenta una sustitución Gln5Ala, que daban lugar a una pérdida muy significativa de la actividad en el ensayo enzimático de dimerización respecto al péptido lineal **1.01** (CI₅₀ = 7.04 vs 47.19 μM).

La síntesis del péptido grapado con el aminoácido Ala (en color rosa) en la posición 5 se realizó siguiendo el mismo procedimiento que para la síntesis de los péptidos grapados **1.37** y **1.41**, descritos anteriormente. Así, sobre la peptidil-resina **1.42** (Esquema 1.12) se llevó a cabo la reacción de metátesis para obtener el intermedio **1.43**, que tras acetilación, desanclaje y purificación por HPLC-semipreparativo dio lugar a los isómeros **1.44a** (isómero minoritario) y **1.44b** (isómero mayoritario) con rendimientos del 1% y del 4% y purezas superiores al 93% y 99% respectivamente (Esquema 1.12).



Esquema 1.12. Síntesis de los péptidos grapados **1.44a,b**, con un residuo de Ala (rosa) en lugar de Gln en la posición 5 de la cadena peptídica.

1.2.3. Estudios estructurales

Con el fin de determinar si los péptidos cíclicos sintetizados se estructuran como hélices α en disolución se llevaron a cabo experimentos de dicroísmo circular, así como estudios teóricos de simulación molecular. Los experimentos de dicroísmo circular los realicé en los laboratorios del Dr. Fernando Díaz (CIB-CSIC) y los estudios teóricos en el grupo del Prof. Federico Gago de la Universidad de Alcalá.

1.2.3.1. Estudios estructurales de dicroísmo circular

Una vez obtenidos los péptidos cíclicos con puente amida (**1.09-1.14**) y los péptidos grapados (**1.37a** y **1.37b**), se realizó un estudio estructural en disolución acuosa mediante espectroscopía de dicroísmo circular.

La espectroscopía de dicroísmo circular se basa en la distinta respuesta que presenta un cromóforo quiral cuando sobre él incide una irradiación de luz circularmente polarizada. En el proceso de interacción entre la luz incidente y la molécula portadora del cromóforo, la absorción de los componentes que integran la irradiación no es homogénea, ocurriendo de forma diferencial según su longitud de onda así como su orientación en el espacio. En este sentido, la irradiación restante (no absorbida) del proceso de interacción luz-cromóforo dependerá de la naturaleza química de la molécula así como de su quiralidad.

Sin duda, una de las mayores aplicaciones del dicroísmo circular es su empleo como técnica para la determinación de la estructura secundaria de proteínas y péptidos⁶⁴⁻⁶⁶. Aunque no permite una resolución atomista, como el caso de la RMN o la cristalografía de rayos X, el dicroísmo circular es una herramienta rápida, sencilla y útil para estudiar procesos en proteínas y péptidos relativos a su conformación espacial.

En la Figura 1.13 se representan de forma esquemática los perfiles ideales de dicroísmo circular característicos de los elementos de estructura secundaria en proteínas, las cuales presentan actividad óptica en la región lejana del UV (180-250 nm). Dependiendo de su estructura secundaria (o de los ángulos diedros del conjunto de los enlaces amida), la intensidad en la absorción en esta región del espectro será distinta, presentado diferentes espectros según sea la estructura secundaria de la proteína:

- **Hélice α :** se caracteriza por presentar dos mínimos negativos a 208 y 222 nm y un máximo positivo a 192 nm.

- **Hoja β :** presenta un solo mínimo negativo a 218 nm y un máximo a 196 nm.
- **Péptido con estructura desordenada (*random coil*):** presenta un mínimo negativo a 195 nm.

Normalmente, la estructura secundaria de una proteína está constituida por estos tres elementos, siendo el espectro de dicroísmo circular una combinación ponderada de los tres casos ideales anteriores.

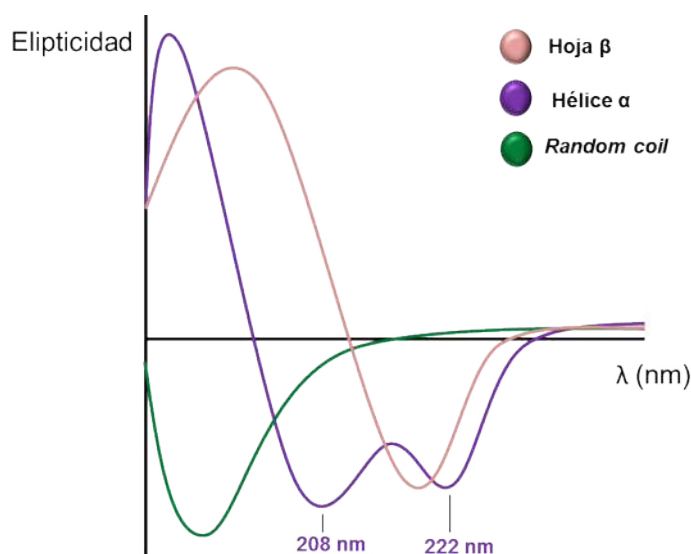


Figura 1.13. Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano para tres estructuras ideales de una proteína: hoja β , hélice α y *random coil*.

Las medidas de dicroísmo circular de los péptidos se llevaron a cabo a 25 °C empleando una disolución acuosa de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) como agente solvatante, debido a que estos péptidos presentan una baja solubilidad en agua. Este co-disolvente, de baja constante dieléctrica respecto al agua y alto momento dipolar, ayuda además a estabilizar proteínas en disolución ya que favorece interacciones intramoleculares^{67,68}. Así, el empleo de este disolvente fluorado mejora tanto la solubilidad de péptidos en medio acuoso como su estructuración.

En trabajos previos de nuestro grupo de investigación¹ se observó que a una concentración del 30% en TFE el efecto estructurante era máximo para los péptidos estudiados, por lo que en los experimentos realizados en esta tesis doctoral se empleó esa misma concentración.

En los ensayos de dicroísmo circular se evaluaron tanto los péptidos cíclicos (amida y grapados) y sus correspondientes precursores lineales, como los prototipos lineales **1.01** (13-*mer*) y **1.05** (9-*mer*).

En la Figura 1.14 se pueden observar los datos obtenidos en los experimentos para los péptidos cortos (9-*mer*). En la gráfica se representan el péptido lineal **1.05** (prototipo de los péptidos cortos) y los péptidos cíclicos con puente amida **1.13** y **1.14** (en morado y en verde en la figura), así como los precursores lineales de los mismos (**1.19** y **1.20**). Únicamente el péptido cíclico **1.14** se estructura como hélice α , presentando los dos mínimos característicos a 208 y 222 nm.

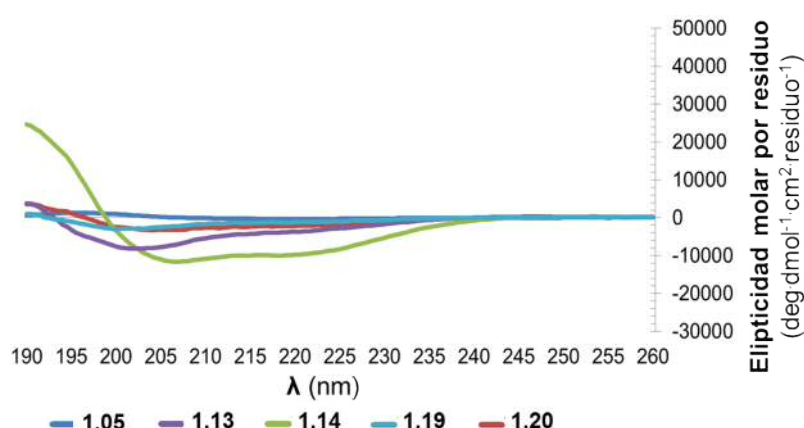


Figura 1.14. Espectros de dicroísmo circular de los péptidos cíclicos **1.13**, **1.14** y los péptidos lineales **1.19** y **1.20** superpuestos con el del prototipo de 9-*mer* **1.05** en disolución acuosa al 30% de TFE a 25 °C.

En la Figura 1.15 se representan los espectros de dicroísmo circular de los péptidos largos (13-*mer*). Así, en la Figura 1.15A se muestran los espectros de los péptidos lineales precursores de los cíclicos amida (**1.15-1.18**) y en la Figura 1.15B se representan los espectros de los péptidos cíclicos amida (**1.09-1.12**) y los isómeros *E/Z* de los péptidos grapados (**1.37a,b**). Pueden observarse los dos mínimos característicos de estructura en hélice α únicamente en el caso de los péptidos cíclicos con puente amida (**1.09-1.12**). La falta de estructura observada para los precursores lineales (**1.15-1.18**) indica que las potenciales interacciones por puente salino entre las cadenas laterales de los residuos de Glu y Lys, que podrían haber estabilizado la estructura de hélice α , no parecen estar favorecidas. Asimismo, a pesar de que en la bibliografía se describen numerosos ejemplos en los que la introducción de un puente hidrocarbonado da lugar a un aumento de helicidad en disolución respecto a los

péptidos lineales, este efecto no se observa en los péptidos grapados sintetizados en este trabajo.

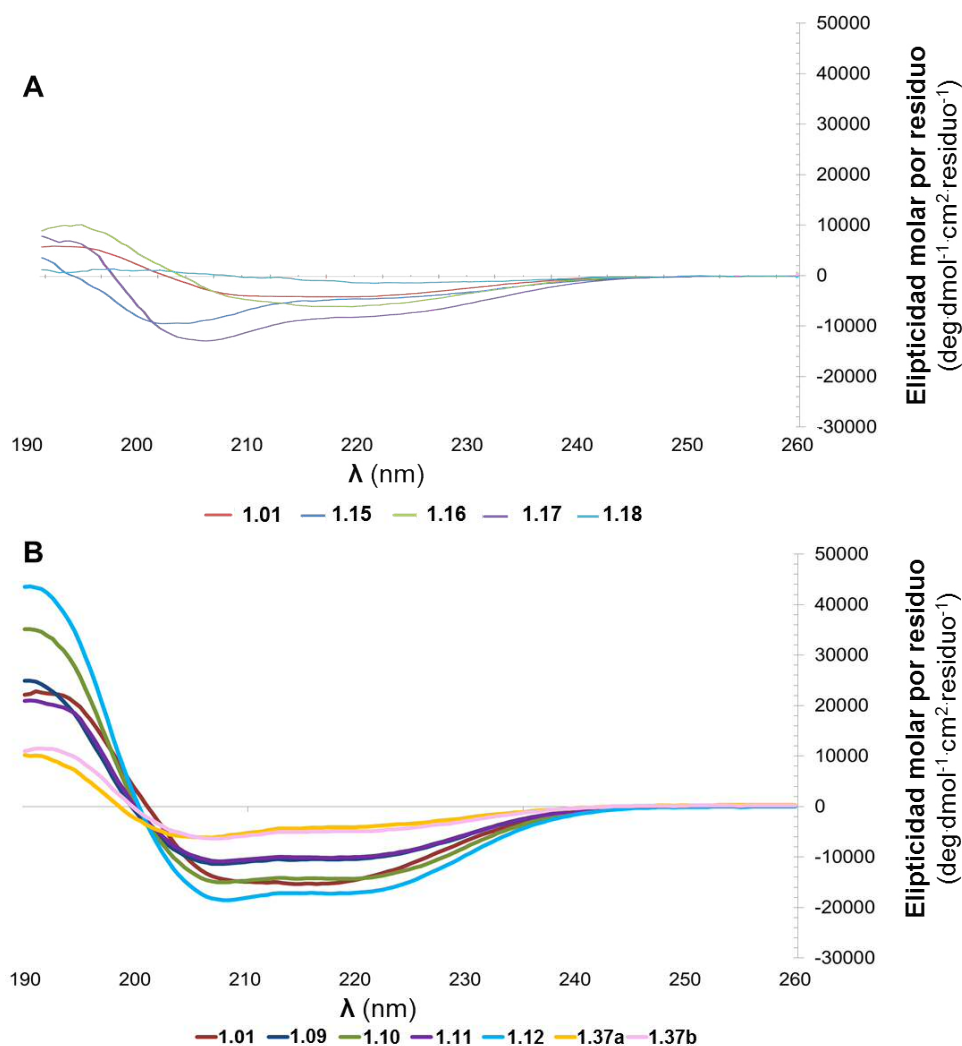


Figura 1.15. A) Espectros de los péptidos lineales precursores de los cíclicos amida (**1.15-1.18**) y prototipo lineal de 13-*mer* **1.01** (rojo oscuro). B) Espectros de los péptidos cíclicos amida (**1.09-1.12**) y de los péptidos grapados (**1.37a** y **1.37b**), comparados con el prototipo lineal **1.01**.

El porcentaje de helicidad α en péptidos pequeños se estimó haciendo uso de la ecuación descrita por Baldwin y colaboradores⁶⁹, que se define como el cociente entre la elipticidad molar por residuo observada a 222 nm en el espectro de dicroísmo circular ($[\theta]_{222}$) y la elipticidad molar máxima ($[\theta]_{\text{máx}}$):

$$[\theta]_{\text{máx}} = (-44000 + 250 T)(1 - k/n)$$

donde T es la temperatura en grados Celsius, k (factor de corrección lineal finita) es una constante que para péptidos pequeños adopta un valor de 4.0^{70} y n es el número de residuos. El valor calculado de $[\theta]_{\text{máx}}$ para los péptidos de 13-*mer* (donde $n = 13$) es de $-26135 \text{ grados}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}\cdot\text{residuo}$ y $-20972 \text{ grados}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}\cdot\text{residuo}$ para los péptidos de 9-*mer* (donde $n = 9$). Los porcentajes de helicidad calculados se recogen en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4. Porcentaje de helicidad (%) de los péptidos estudiados en disolución acuosa con un 30% de TFE y a 25 °C.

		Péptidos	Helicidad (%)
9- <i>mer</i>	Prototipo lineal		1.05
	Péptidos amida	Péptidos cíclicos amida	1.13
			1.14
		Precursores lineales	1.19
			1.20
13- <i>mer</i>	Prototipo lineal		1.01
	Péptidos amida		1.15
		Precursores lineales	1.16
			1.17
			1.18
			1.09
		Péptidos cíclicos amida	1.10
			1.11
			1.12
	Péptidos grapados	Precursores lineales	1.36
			1.40
		Péptidos cíclicos grapados	1.37a
			1.37b
			1.41b

*Porcentaje de helicidad experimental determinado mediante el cociente de $[\theta]_{222}/[\theta]_{\text{máx}}$, donde se determinó $[\theta]_{\text{máx}} = -26135 \text{ grado}\cdot\text{dmol}^{-1}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{residuo}^{-1}$ para los péptidos de 13-*mer* y $[\theta]_{\text{máx}} = -20972 \text{ grado}\cdot\text{dmol}^{-1}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{residuo}^{-1}$ para los péptidos de 9-*mer*, según el procedimiento descrito por Baldwin y colaboradores.

Los valores de porcentaje de helicidad muestran que, en general, los péptidos lineales (precursores y prototipos) se estructuran mucho peor como hélices α que los correspondientes péptidos cíclicos amida. En cuanto a los péptidos cíclicos con un puente amida el porcentaje de helicidad varía en función de la longitud del péptido y de la posición de ciclación siendo más helicoidales, en general, los péptidos largos (13-*mer*). La variación de helicidad con la posición de ciclación es un efecto bastante llamativo para el caso de los péptidos cíclicos cortos, donde se observa que el péptido **1.14** (con un enlace amida entre las posiciones 4 y 8) presenta un porcentaje de helicidad 3 veces superior que **1.13** (con un enlace amida entre las posiciones 3 y 7). Como ya se ha mencionado anteriormente los péptidos cíclicos a través de puentes hidrocarbonados no se estructuran bien como hélices α observándose porcentajes de helicidad menores que los de sus correspondientes péptidos amida (en las mismas posiciones de ciclación), siendo estos similares a los del péptido lineal de referencia **1.01**.

Con el fin de racionalizar algunas de las diferencias de helicidad más significativas observadas experimentalmente se realizaron estudios teóricos de simulación molecular en caja de agua.

1.2.3.2. Estudios estructurales de simulación molecular

La evaluación del grado de helicidad de cada uno de los péptidos se llevó a cabo mediante simulación de dinámica molecular (DM) haciendo uso del programa AMBER⁷¹ (*Assisted Model Building with Energy Refinement*), uno de los programas *in silico* más utilizados para la simulación de biomoléculas.

Para llevar a cabo la simulación, los péptidos se situaron en una caja rectangular de aguas TIP3P⁷² separados unos 12 Å de los límites de la caja (Figura 1.16). Todos los péptidos se simularon con los extremos *N*- y *C*-terminal protegidos en forma de acetilo y carboxamida terminal, respectivamente.

Los sistemas se construyeron usando la herramienta *tLeap*, integrada en AMBER⁷¹. En aquellas secuencias peptídicas en las que había residuos no proteinogénicos, tales como Nle, fue necesario construir previamente los archivos PREP de entrada de dichos residuos. Una vez construido el sistema a simular, los pasos que se siguieron fueron: (1) minimización de las moléculas de agua e iones presentes en la caja rectangular, (2) calentamiento del sistema (sin ninguna restricción) desde 100 a 300 K, (3) equilibrado del sistema (en cinco ciclos

consecutivos, donde se van liberando todas las moléculas del sistema), y (4) por último, la simulación de DM (Figura 1.16). Todas las dinámicas moleculares para los péptidos se llevaron a cabo a 300 K durante 100 ns sin ningún tipo de restricción.

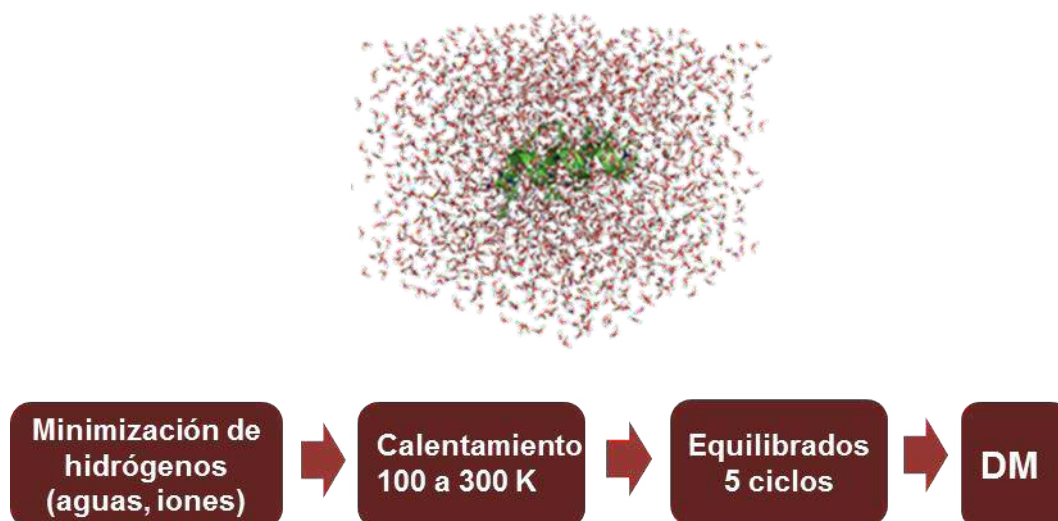


Figura 1.16. Los péptidos (en verde) se simularon en una caja rectangular en agua a 300 K durante 100 ns. Arriba se indica una imagen de la caja de agua. Abajo se indican los pasos seguidos en la simulación de DM.

Dinámica molecular en caja de agua de los péptidos cortos 1.05, 1.13 y 1.14 (9-mer)

Como se ha visto anteriormente (apartado 1.2.3.1), los experimentos de dicroísmo circular mostraron la gran influencia de la posición de ciclación en la helicidad de los péptidos cíclicos con puente amida cortos (9-mer) siendo el porcentaje de helicidad del péptido cíclico **1.14** muy superior al del péptido cíclico **1.13**. Por otro lado, la helicidad del péptido **1.05** (prototipo lineal de los mismos) era muy baja.

Los estudios de dinámica molecular con estos tres compuestos revelaron que el péptido **1.05** no se estructura como hélice en disolución (Figura 1.17), mientras que los péptidos **1.13** y **1.14** sí lo hacen (Figura 1.18), si bien se observa en la simulación que el enlace amida entre las posiciones 4 y 8 (**1.14**) hace que la Ile9 y la Gln5 se posicionen mejor, no habiendo demasiadas fluctuaciones en el esqueleto carbonado del péptido. Cabe destacar además que se ha sustituido el residuo de Gly8 (que por su mayor flexibilidad da lugar a una reducción de helicidad) por Lys para la ciclación en el péptido **1.14**. El hecho de tener el enlace amida entre las posiciones 3 y 7 (**1.13**) hace que la Ile9 y la Gln5 no se dispongan en la posición adecuada y que se pierda en algunos momentos la estructura helicoidal. Además, el hecho de que el ciclo se sitúe

entre los residuos 3 y 7, manteniendo el residuo de Gly8, hace que se desestructure la hélice hacia el extremo *C*-terminal y sólo se estructure bien dicha hélice hacia el extremo *N*-terminal. El resultado global de la simulación mostró que el péptido **1.14** presentaba más confórmeros que se estructuran como hélice α que el péptido **1.13**. Estos resultados podrían explicar los resultados experimentales obtenidos en los experimentos de dicroísmo circular.

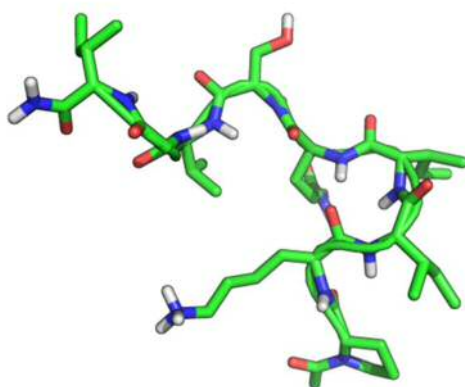


Figura 1.17. Imagen de un representante del *cluster* de confórmeros mayoritario a lo largo de la DM de **1.05** en caja de agua.

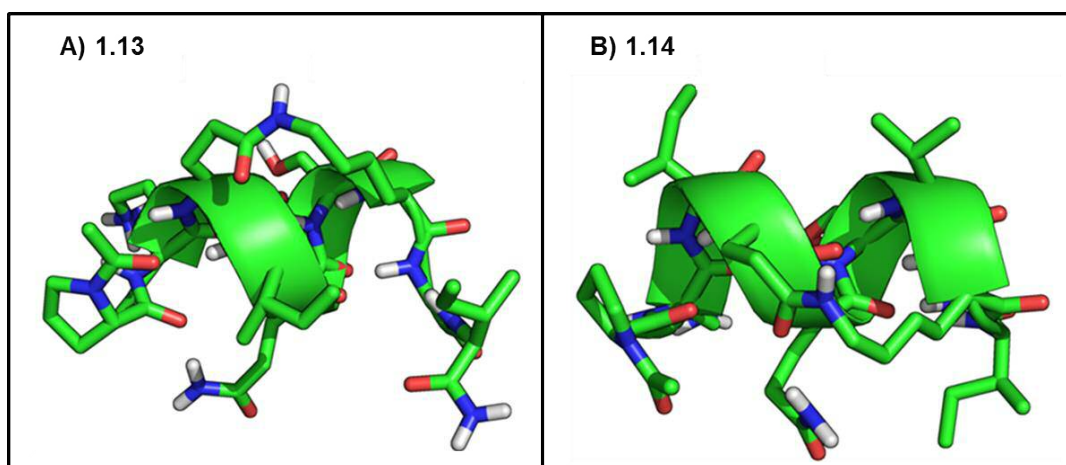


Figura 1.18. A) Imagen de un representante del *cluster* de confórmeros mayoritario a lo largo de la DM de **1.13** en caja de agua (>60% de los confórmeros se estructuran como hélice α). B) Imagen de un representante del *cluster* de confórmeros mayoritario a lo largo de la DM de **1.14** en caja de agua (>70% de los confórmeros se estructuran como hélice α).

Dinámica molecular en caja de agua de los péptidos cíclicos con puente amida 1.09 y los péptidos grapados 1.37a,b (13-mer)

Como se mencionó anteriormente en los experimentos de dicroísmo circular se observaron grandes diferencias en helicidad entre los péptidos cíclicos largos (13-mer)

dependiendo de la naturaleza del puente. Así, los péptidos cíclicos con puente amida presentaron porcentajes de helicidad superiores a sus correspondientes péptidos grapados (con un puente hidrocarbonado). Con el fin de racionalizar estos resultados se realizaron estudios comparativos de dinámica molecular en caja de agua con el péptido cíclico amida **1.09** y los isómeros grapados **1.37a,b** ciclados entre las posiciones 3 y 7, que en los experimentos de dicroísmo circular habían mostrado unos valores de helicidad del 40% y 12%, respectivamente. Los resultados más significativos de las simulaciones de DM realizadas en caja de agua para **1.09** y **1.37a,b** se muestran en la Figura 1.19. Como se puede observar, el péptido cíclico con un enlace amida **1.09** se estructura mayoritariamente como hélice α , ya que la mayoría de los conformeros de este compuesto presentan dicha estructura. Sin embargo, en el caso de los péptidos grapados **1.37a** y **1.37b** se observa una clara desestructuración de la hélice en los residuos de las posiciones anteriores y posteriores a la grapa. Así, los residuos de Pro1 y Lys2 se encuentran desestructurados, sucediendo lo mismo en los residuos situados hacia el extremo C-terminal. Al igual que ocurría para el péptido **1.13**, el hecho de que la posición de ciclación se sitúe entre los residuos 3 y 7, quedando libre la Gly8, hace que se desestructure la hélice.

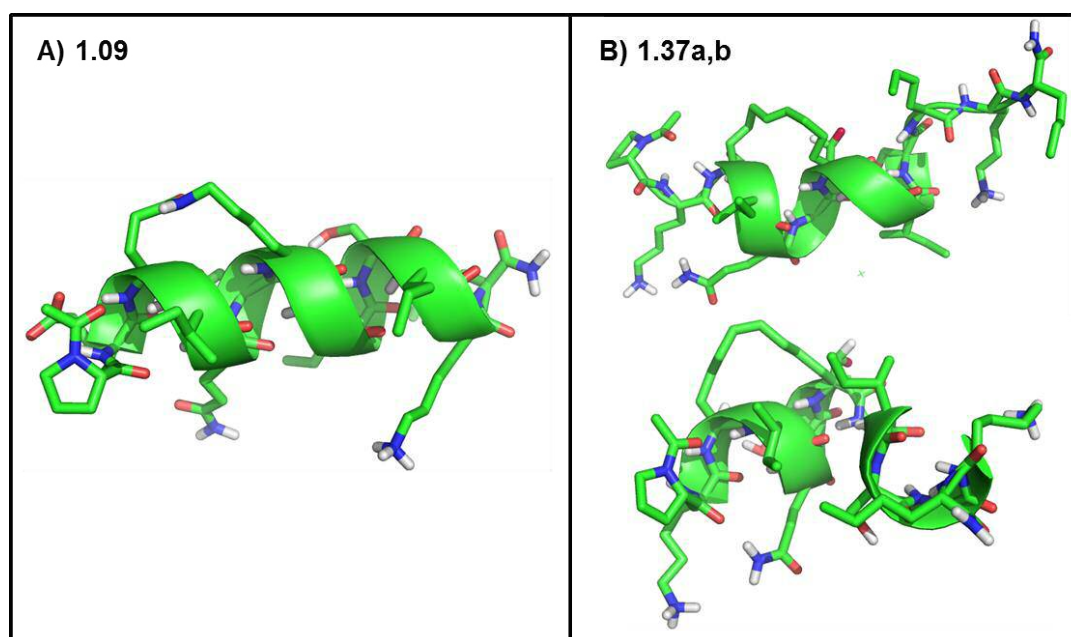


Figura 1.19. A) Imagen de un representante del *cluster* mayoritario de conformeros a lo largo de la simulación DM de **1.09** en caja de agua (>68% de los conformeros se estructuran como hélice α). B) Imagen de un representante del *cluster* mayoritario de conformeros a lo largo de la simulación de DM de los isómeros **1.37a,b** en caja de agua (>86% de los conformeros de **1.37a** no se estructuran como hélice α y >51% de los conformeros de **1.37b** no se estructuran como hélice α).

1.2.4. Evaluación biológica de los péptidos cíclicos

Siguiendo los protocolos descritos para la evaluación de los péptidos lineales, en la Tabla 1.5 se recogen los datos de inhibición de la actividad oxidorreductasa y de dimerización de la *Li-TryR* obtenidos para los péptidos cíclicos con puente amida (13-mer y 9-mer), así como de sus precursores lineales, los cuales se evaluaron únicamente en el ensayo de actividad oxidorreductasa (Tabla 1.5). Como controles positivos en estos ensayos se incluyeron los péptidos lineales de referencia **1.01** (13-mer) y **1.05** (9-mer).

Tabla 1.5. Valores de $CI_{50} \pm DE$ (desviación estándar) (μM) obtenidos en los ensayos de inhibición de la actividad oxidorreductasa y dimerización para los péptidos cíclicos amida **1.09-1.14**, los precursores lineales **1.15-1.20** y los péptidos lineales de referencia **1.01** y **1.05**.

		Péptidos	CI_{50} act. (μM)*	CI_{50} dim. (μM)*
Péptidos cíclicos amida	13-mer	1.09 Ac-PK(EIQS K)GISNleKNle-NH ₂	1.21 \pm 0.07	12.46 \pm 2.40
		1.10 Ac-PKI(EQSV K)ISNleKNle-NH ₂	7.95 \pm 1.43	4.57 \pm 0.19
		1.11 Ac-PKIIQS(EGIS K)KNle-NH ₂	>200	>75
		1.12 Ac-PKIIQSV(EISNle K)Nle-NH ₂	26.71 \pm 5.92	13.03 \pm 0.27
	9-mer	1.13 Ac-PK(EIQS K)GI-NH ₂	>200	>75
		1.14 Ac-PKI(EQSV K)I-NH ₂	>200	>75
Precursores lineales	13-mer	1.15 Ac-PKEIQS K GISNleKNle-NH ₂	>200	-
		1.16 Ac-PKIEQSV K ISNleKNle-NH ₂	>200	-
		1.17 Ac-PKIIQSEGIS K KNle-NH ₂	>200	-
		1.18 Ac-PKIIQSV E ISNle K Nle-NH ₂	>200	-
	9-mer	1.19 Ac-PKEIQS K GI-NH ₂	>200	-
		1.20 Ac-PKIEQSV K I-NH ₂	45.26 \pm 8.87	-
Prototipos	13-mer	1.01 Ac-PKIIQSVGISNleKNle-NH ₂	1.50 \pm 0.15	7.04 \pm 0.56
	9-mer	1.05 Ac-PKIIQSVGI-NH ₂	4.01 \pm 0.31	17.55 \pm 0.63

*Concentración inhibitoria necesaria para inhibir al 50% la actividad de la enzima o el 50% de la formación del homodímero. Los experimentos se realizan por triplicado.

Los resultados recogidos en la tabla muestran que ninguno de los precursores lineales inhibe la actividad oxidorreductasa de la enzima, a excepción del péptido corto **1.20** que presenta unos valores de actividad moderados.

En cuanto a los péptidos cíclicos, la posición de ciclación y la longitud del péptido son importantes para la actividad. Así, los péptidos cíclicos **1.13** y **1.14** (9-*mer*) son inactivos independientemente de la posición de ciclación. Sin embargo, los péptidos cíclicos más largos **1.09** y **1.10** (13-*mer*) en los que el puente amida se sitúa más próximo al extremo *N*-terminal muestran un potente efecto inhibitorio con unos valores medios de CI_{50} similares o ligeramente inferiores a los del péptido lineal **1.01** tanto en el ensayo de actividad oxidorreductasa como de dimerización. La ciclación a través de las posiciones 7 y 11 (**1.11**) da lugar a una pérdida de la actividad en ambos ensayos mientras que la introducción de un enlace covalente entre las posiciones 8 y 12 (**1.12**) se traduce en una disminución de la actividad enzimática respecto al péptido lineal **1.01** (valores de CI_{50} act. 18 veces superiores), aunque en el ensayo de dimerización se observa un valor de CI_{50} dim. similar al del péptido de referencia.

En la Tabla 1.6 se recogen los valores de CI_{50} obtenidos en los ensayos de inhibición de la actividad oxidorreductasa y de dimerización para los péptidos grapados **1.37a,b** y **1.41b** con un puente hidrocarbonado entre las posiciones 3/7 y 4/8, respectivamente, así como para sus precursores lineales **1.36** y **1.40**, respectivamente. Además se recogen los datos del péptido grapado **1.44a,b** portador de un residuo de Ala en lugar de Gln en la posición 5 de la cadena peptídica. Se incluyen como control el péptido lineal prototipo **1.01** y los péptidos cíclicos a través de puente amida en las mismas posiciones **1.09** y **1.10** utilizados como referencia.

En el ensayo de actividad enzimática se observa una diferencia significativa entre los dos isómeros *E/Z* del péptido grapado **1.37a,b** entre las posiciones 3 y 7 siendo el isómero mayoritario (**1.37b**) 5 veces más activo que el isómero minoritario (**1.37a**) y que su correspondiente precursor lineal (**1.36**). El péptido grapado **1.41b** entre las posiciones 4 y 8 resultó ser 2 veces más activo que su precursor lineal **1.40**. Los valores de CI_{50} del compuesto **1.37b**, en el rango micromolar, son similares a los de los péptidos **1.01** (prototipo lineal) y **1.09** (péptido cíclico con puente amida entre las mismas posiciones). A su vez, el péptido grapado **1.41b** presenta una CI_{50} prácticamente igual a la de **1.10** (péptido cíclico con un puente amida entre las mismas posiciones de ciclación). La posición del puente hidrocarbonado no parece ser determinante para la actividad, ya que los valores de CI_{50} de los isómeros mayoritarios de los dos péptidos grapados, en las posiciones exploradas, son prácticamente iguales (**1.37b** vs **1.41b**). De esta manera, se ha conseguido obtener dos péptidos grapados, que podrían ser “a priori” capaces de atravesar membranas celulares, con un potente efecto inhibitorio, similar al de los prototipos originales.

CAPÍTULO 1

Tabla 1.6. Valores de $CI_{50} \pm DE$ (desviación estándar) (μM) obtenidos en los ensayos de inhibición de la actividad oxidorreductasa y dimerización de los péptidos cíclicos grapados **1.37a,b**, **1.41** y **1.44a,b**, los precursores lineales **1.36** y **1.40**, el péptido lineal **1.01** y los péptidos cíclicos con puente amida **1.09** y **1.10**.

	Péptidos	CI_{50} act. (μM)*	CI_{50} dim. (μM)*
Precursores lineales	1.36 Ac-PK(AIQSA)GISNleKNle-NH ₂	35.39 \pm 3.10	-
	1.40 Ac-PKI(AQSV)AISNleKNle-NH ₂	14.15 \pm 1.65	Enhancer
Péptidos grapados	1.37a (isómero minoritario) Ac-PK(AIQSA)GISNleKNle-NH ₂	33.80 \pm 12.99	> 75
	1.37b (isómero mayoritario) Ac-PK(AIQSA)GISNleKNle-NH ₂	7.23 \pm 0.36	Enhancer
	1.41b Ac-PKI(AQSV)AISNleKNle-NH ₂	7.39 \pm 0.74	Enhancer
	1.44a (isómero minoritario) Ac-PK(AIASA)GISNleKNle-NH ₂	-	> 75
	1.44b (isómero mayoritario) Ac-PK(AIASA)GISNleKNle-NH ₂	-	> 75
Prototipos	1.01 Ac-PKIIQSVGISNleKNle-NH ₂	1.50 \pm 0.15	7.04 \pm 0.56
	1.09 Ac-PK(EIQSK)GISNleKNle-NH ₂	1.21 \pm 0.07	12.46 \pm 2.40
	1.10 Ac-PKI(EQSVK)ISNleKNle-NH ₂	7.95 \pm 1.43	4.57 \pm 0.19

*Concentración inhibitoria necesaria para inhibir al 50% la actividad de la enzima o el 50% de la formación del homodímero. Los experimentos se realizan por triplicado.

En cuanto a los ensayos de dimerización, cabe señalar el efecto del aumento de la formación de dímero (*enhancer*) que presentan los péptidos **1.37b**, **1.40** y **1.41b**, comportándose como estabilizadores del proceso de dimerización y no como inhibidores, tal y como ocurría con los péptidos cíclicos con puente amida. Sin embargo, el isómero **1.37a** resultó ser inactivo en estos experimentos. En la Figura 1.20 se reflejan los resultados del ensayo de dimerización para los isómeros mayoritarios de los péptidos grapados **1.37b** y **1.41b**. En estos ensayos se mide el porcentaje de dímero formado a diferentes concentraciones de los compuestos **1.37b** ó **1.41b**, observándose que a medida que aumenta la concentración de péptido también aumenta el porcentaje de dímero formado. Sin embargo, el isómero

minoritario **1.37a** no tuvo ningún efecto en este ensayo a la concentración máxima empleada (75 μM).

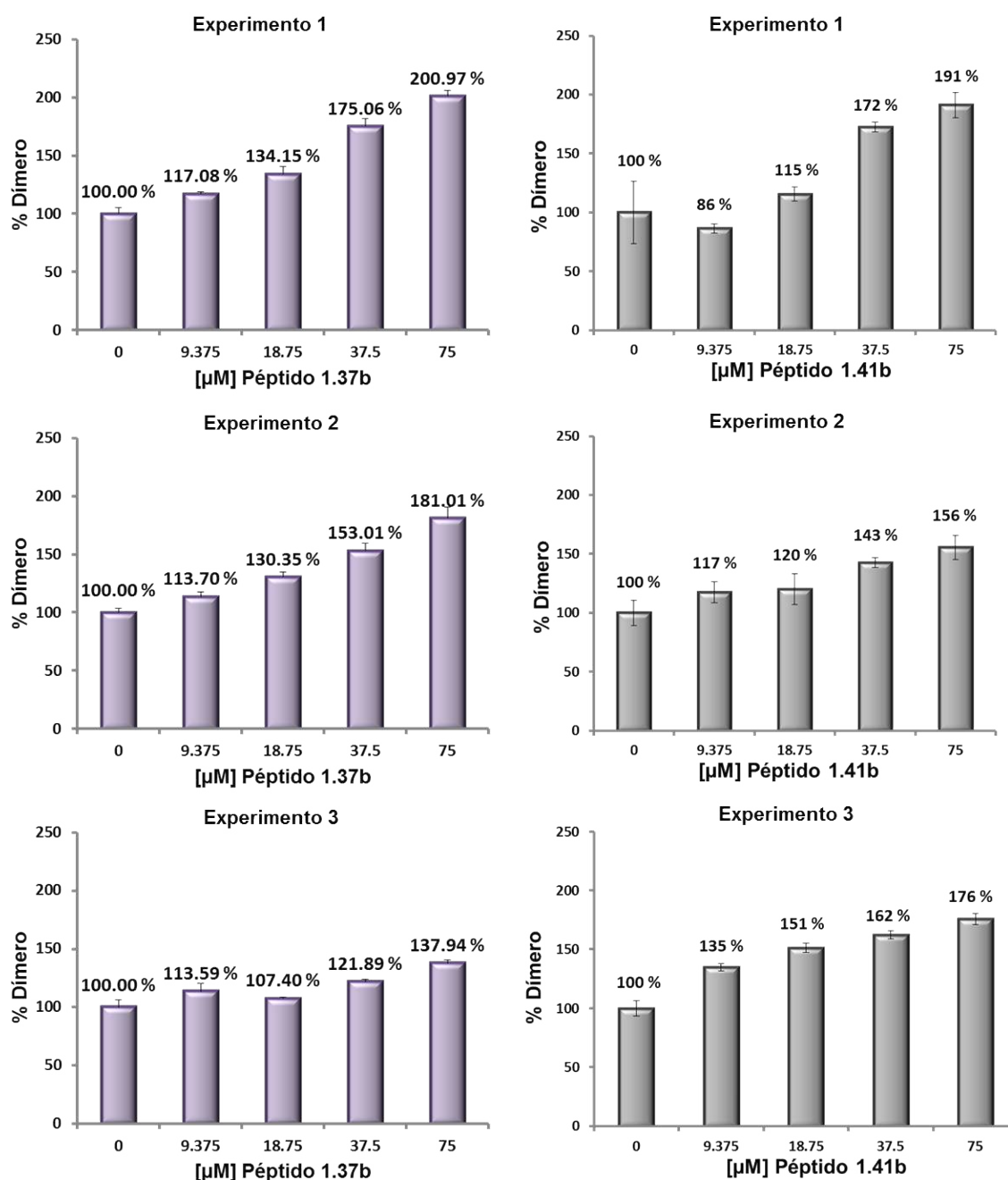


Figura 1.20. Experimento de dimerización realizado por triplicado para los péptidos **1.37b** y **1.41b**.

Con el fin de estudiar el efecto estabilizador de **1.37b**, se decidió sintetizar y evaluar un péptido grapado análogo del mismo en el que se sustituyó el residuo de Gln5 por Ala. Así, en la Tabla 1.8 se observa que ninguno de los dos isómeros del péptido grapado resultante **1.44a,b** mostraban ningún efecto en el ensayo de dimerización, lo que parece indicar que la Gln5 es importante para el efecto

estabilizador en este péptido. En la actualidad se están llevando a cabo estudios de cocrystalización de los péptidos estabilizadores del homodímero con la TryR de *L. Infantum* en colaboración con el Prof. Juan Hermoso (IQFR-CSIC), que nos podrían ayudar a determinar su modo de interacción con la enzima.

Un ejemplo de estabilización de proteínas heterodiméricas mediada por moléculas pequeñas, es el caso del efavirenz, un inhibidor de la transcriptasa inversa (TI) del VIH^{73,74}, aunque su significado biológico está aún por determinar. En la bibliografía cada vez existen más publicaciones relativas a estabilizadores de interacciones proteína-proteína, tanto de moléculas pequeñas como de productos naturales.^{75,76} Así, por ejemplo, en el caso de la interacción entre las proteínas 14-3-3/Tau, en el campo de investigación del Alzheimer, se acaba de publicar que estabilizadores de esta IPP se unen a regiones próximas, aunque diferentes, a las de los inhibidores.⁷⁷ Además, se han empleado las estructuras cristalinas de los complejos proteína-estabilizador para un diseño racional de nuevos inhibidores.⁷⁷

1.3. Foldámeros (Serie 3)

De forma paralela a la síntesis y estudio de los péptidos cíclicos nos planteamos la preparación de foldámeros, peptidomiméticos pertenecientes a la Clase B según la clasificación de Grossman² comentada en la introducción, con el fin de mejorar la estabilidad proteolítica del péptido lineal prototipo **1.01**, que como se verá a continuación es muy baja.

Los foldámeros, descritos por primera vez en 1998 por Gellman⁷⁸, son estructuras oligoméricas no naturales con una fuerte tendencia a adoptar estructuras secundarias bien definidas con una conformación específica compacta y predecible. El hecho de que estas estructuras incorporen aminoácidos no naturales en la cadena peptídica les confiere una mayor estabilidad, tanto proteolítica⁷⁹ como metabólica⁸⁰, que la de los péptidos naturales.

En la bibliografía se han descrito diversos tipos de foldámeros como inhibidores de IPPs^{81,82} atendiendo a los diferentes aminoácidos no naturales que incorporan en su estructura, como son los β -péptidos^{83,84}, los péptidos- α/β ⁸⁵⁻⁸⁸, los peptoides⁸⁹⁻⁹¹ (aminoácidos *N*-alquilados) o combinaciones de ambos, como es el caso de los β -peptoides (formados por β -péptidos y peptoides) descritos recientemente⁹².

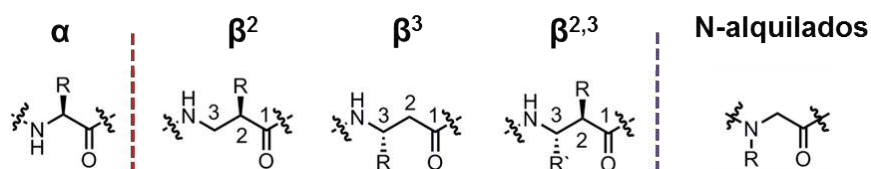


Figura 1.21. Aminoácidos presentes en α - y β -péptidos, así como en peptoides (aminoácidos *N*-alquilados).

Los foldámeros más estudiados son los β -péptidos^{83,84}, cuya síntesis consiste en el acoplamiento consecutivo de β -aminoácidos, portadores de un metileno adicional en la cadena hidrocarbonada respecto a los α -aminoácidos. Existen diferentes tipos de β -aminoácidos: los β^2 y los β^3 -aminoácidos, en los que se sitúa una única cadena lateral en los carbonos C_2 o C_3 , respectivamente; así como $\beta^{2,3}$ -aminoácidos en los que ambos átomos de carbono están sustituidos (Figura 1.21). Los β -péptidos presentan una mayor tendencia a estructurarse como hélices que sus correspondientes α -péptidos en disolventes orgánicos pero menor en disoluciones acuosas, por lo que se han desarrollado numerosas estrategias con el fin de solventar este problema tales como la introducción de β -aminoácidos cíclicos^{93,94}, la incorporación de puentes salinos intramoleculares (β^3 -Glu/ β^3 -Lys y β^3 -Glu/ β^3 -Orn)⁹⁵⁻⁹⁷, etc.

Otro tipo de foldámeros ampliamente utilizados son los péptidos- α/β ⁸⁵⁻⁸⁸, que están formados por combinaciones de α - y β -aminoácidos a lo largo de la cadena peptídica. Así, algunos de los α -aminoácidos de la cadena peptídica se sustituyen de forma sistemática por β^3 -aminoácidos con patrones de sustitución definidos, pudiendo conservarse todas las cadenas laterales de los correspondientes α -aminoácidos. De esta manera, es posible mantener las interacciones clave con la proteína, manteniendo la estructura de hélice α a la vez que se aumenta la resistencia a la proteólisis⁹⁸. Además, al incorporar un metileno adicional por cada β^3 -aminoácido, se añade un grado mayor de flexibilidad a la cadena peptídica. Este tipo de estructuras requieren un menor número de residuos para la formación de una estructura de hélice α que los péptidos α naturales.⁹⁹

El último tipo de foldámeros mencionado son los peptoides⁸⁹⁻⁹¹, formados por α -aminoácidos en los que se introducen las cadenas laterales en los nitrógenos amida, en lugar de en el átomo de carbono α (Figura 1.21, aminoácidos *N*-alquilados). Estos foldámeros presentan un alto grado de diversificación, son muy resistentes a la proteólisis y permiten mejorar la permeabilidad celular.

En este trabajo dentro de los distintos tipos de foldámeros nos hemos centrado en la preparación de péptidos- α/β .

1.3.1. Diseño de los péptidos- α/β

El patrón de sustitución más utilizado en la síntesis de foldámeros como miméticos de hélices α es $\alpha\beta\alpha\alpha\beta$, donde todos los β^3 -aminoácidos se encuentran formando una línea a lo largo de una de las caras de la hélice α . También se pueden encontrar en la bibliografía otros patrones de sustitución como $\alpha\alpha\beta$ o $\alpha\alpha\beta$, donde los β^3 -aminoácidos se encuentran formando una espiral a lo largo de la hélice α ¹⁰⁰⁻¹⁰² (Figura 1.22).

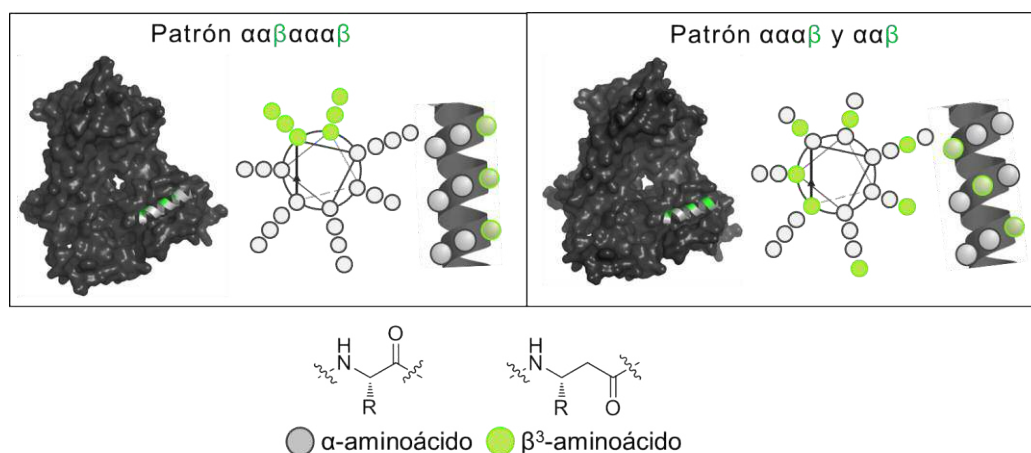


Figura 1.22. Esquema representativo de la estructura de los péptidos- α/β en función del diferente tipo de patrón empleado.

Basándonos en los patrones $\alpha\beta\alpha\alpha\beta$ y $\alpha\alpha\beta$, que según se describe en la bibliografía han resultado ser útiles para el diseño de miméticos de hélices α como inhibidores de IPPs^{102,103}, se realizó la sustitución, de manera sistemática, de todos los residuos posibles siguiendo dichos patrones en el péptido **1.01** (13-mer).

Péptido 1.01
Ac-PKIIQSVGISNleKNle-NH₂

↓

SERIE 3		
PATRÓN $\alpha\beta\alpha\alpha\beta$	Ac-PK β^3 IIQS β^3 VGI β^3 SNleKNle-NH ₂	1.45
	Ac-PKI β^3 IQS β^3 VGIS β^3 NleKNle-NH ₂	1.46
	Ac- β^3 PKI β^3 IQSV β^3 AI β^3 SNleKNle-NH ₂	1.47
	Ac-PK β^3 IIQ β^3 SVGI β^3 SNleK β^3 Nle-NH ₂	1.48
	Ac- β^3 PKII β^3 QSV β^3 AI β^3 SNle β^3 KNle-NH ₂	1.49
	Ac-P β^3 KII β^3 QSVG β^3 ISNle β^3 KNle-NH ₂	1.50
PATRÓN $\alpha\alpha\beta$	Ac-P β^3 KIIQ β^3 SVG β^3 ISNleK β^3 Nle-NH ₂	1.51
	Ac-PK β^3 IIQS β^3 VGIS β^3 NleKNle-NH ₂	1.52
	Ac-PKI β^3 IQSV β^3 AI β^3 SNle β^3 KNle-NH ₂	1.53

Figura 1.23. Péptidos- α/β objeto de estudio.

Los péptidos diseñados se recogen en la Figura 1.23, donde se puede observar que los péptidos **1.45-1.51** están basados en el patrón $\alpha\beta\alpha\alpha\beta$ y los péptidos **1.52** y **1.53** en el $\alpha\alpha\beta$.

1.3.2. Síntesis de los péptidos- α/β

La síntesis de los péptidos- α/β se llevó a cabo siguiendo la metodología estándar de síntesis de péptidos lineales en fase sólida mencionada anteriormente (apartado 1.1.1), empleando una resina *MBHA* de tipo amida *Rink* de carga 0.56 mmol/g a partir de los correspondientes β^3 -aminoácidos obtenidos de fuentes comerciales. Todos los acoplamientos se realizaron en microondas a 40 °C empleando HCTU como agente de acoplamiento y DIEA como base. La síntesis de los foldámeros se realizó en paralelo dividiendo la resina en las etapas intermedias apropiadas de la síntesis tal y como se detalla en los Esquemas 1.13, 1.14 y 1.15 (β^3 -aminoácidos en verde). En la Tabla 1.7 se recogen los datos analíticos y rendimientos globales de los péptidos- α/β sintetizados, donde se observa que estos se obtuvieron con rendimientos comprendidos entre 11-45% y purezas superiores al 91% tras purificación cromatográfica en fase reversa en un equipo Biotage®.

Tabla 1.7. Datos analíticos y rendimientos globales de los foldámeros sintetizados.

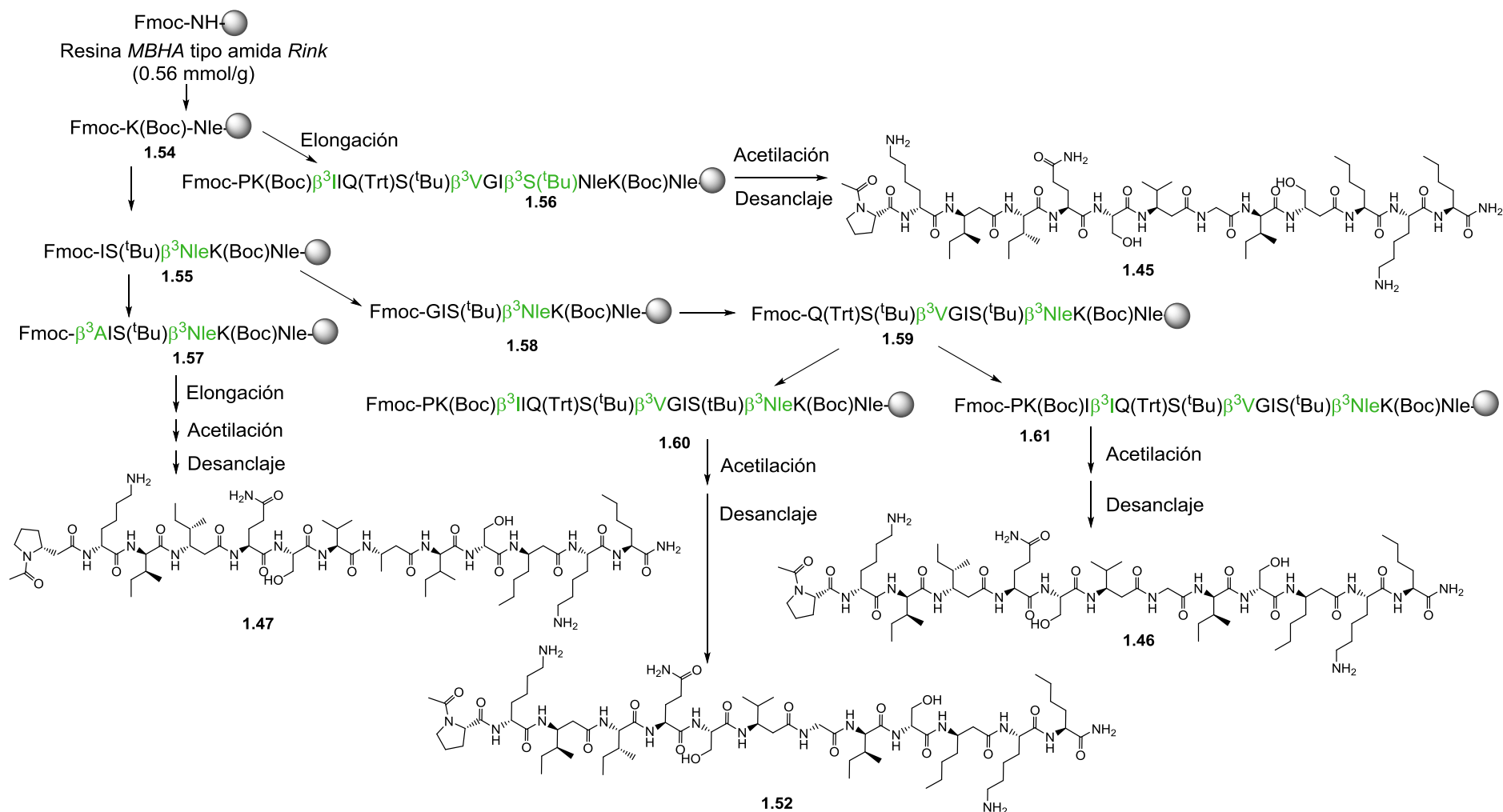
	Péptido	Fórmula molecular	Masa exacta calc.	m/z obs.	t _R [*] (min)	Pureza [*] (%)	Rto global (%)
$\alpha\beta\alpha\alpha\beta$	1.45	C ₇₀ H ₁₂₇ N ₁₇ O ₁₇	1477.9596	740.9904	8.62	91	13
	1.46	C ₇₀ H ₁₂₇ N ₁₇ O ₁₇	1477.9596	739.9877	8.15	98	23
	1.47	C ₇₂ H ₁₃₁ N ₁₇ O ₁₇	1505.9909	754.0023	9.61	95	21
	1.48	C ₇₁ H ₁₂₉ N ₁₇ O ₁₇	1491.9752	746.9922	8.58	98	26
	1.49	C ₇₂ H ₁₃₁ N ₁₇ O ₁₇	1505.9909	1507.0004	8.66	94	22
	1.50	C ₇₁ H ₁₂₉ N ₁₇ O ₁₇	1491.9752	1592.9788	7.72	99	45
	1.51	C ₇₁ H ₁₂₉ N ₁₇ O ₁₇	1491.9752	746.9897	8.26	96	11
$\alpha\alpha\beta$	1.52	C ₇₀ H ₁₂₇ N ₁₇ O ₁₇	1477.9596	739.9975	7.90	94	19
	1.53	C ₇₁ H ₁₂₉ N ₁₇ O ₁₇	1491.9752	1492.9874	8.58	97	23

*Medido en HPLC analítico a 214 nm y con el gradiente 1 descrito en la parte experimental.

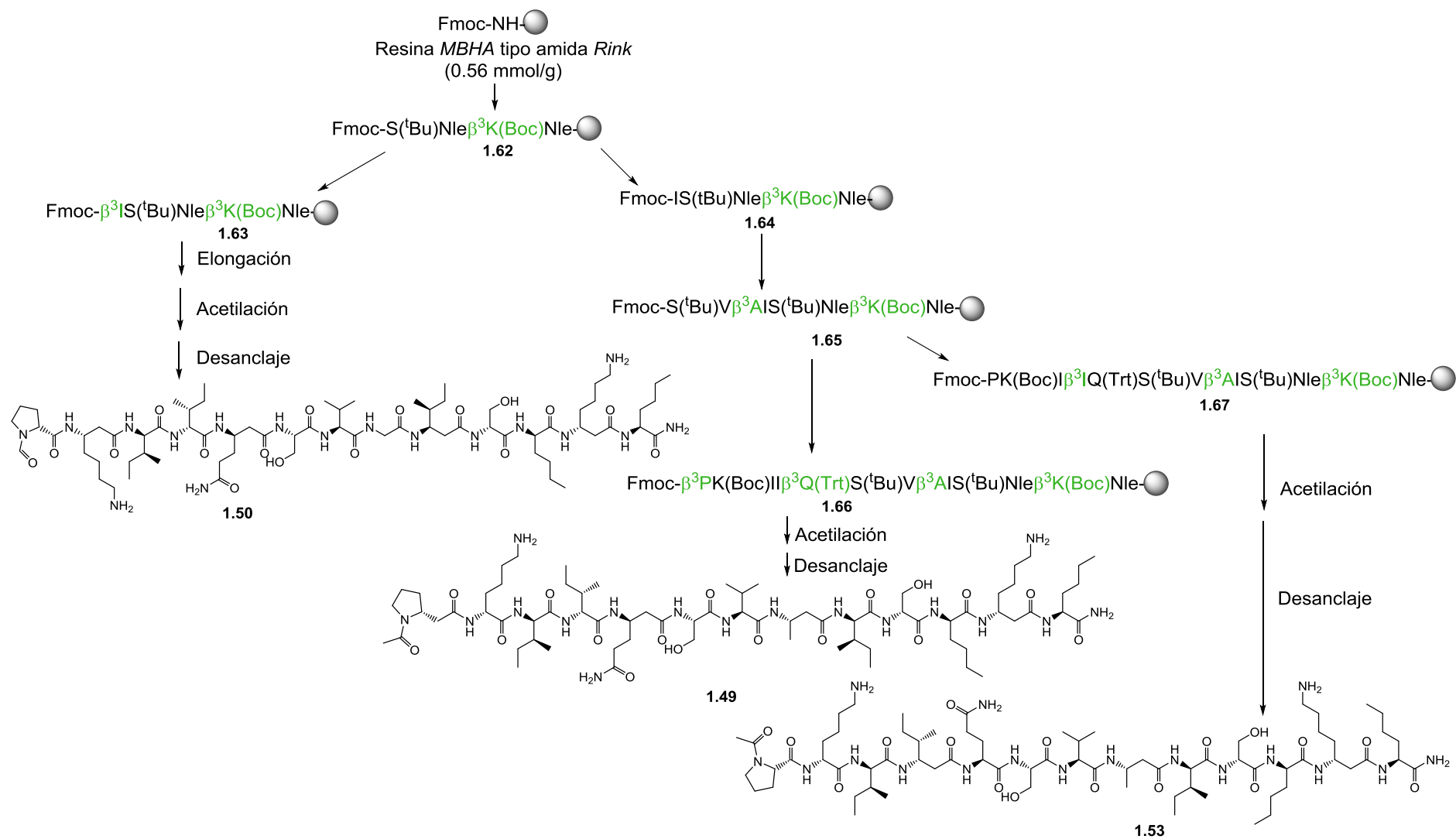
En el Esquema 1.13 se detalla la síntesis de los foldámeros **1.45**, **1.46**, **1.47** y **1.52**. En esta síntesis, realizada en paralelo, se preparó en primer lugar la peptidil-resina **1.54** que contenía los residuos de Nle y Lys, protegido con el grupo Boc. A continuación, se dividió la resina para, por un lado, obtener la peptidil-resina **1.55** y por otro, la peptidil-resina **1.56** tras la elongación con los correspondientes aminoácidos. Tras la acetilación y el desanclaje de la peptidil-resina **1.56** se obtuvo el foldámero deseado **1.45**. A partir de la peptidil-resina **1.55** se obtuvieron las peptidil-resinas **1.57** y **1.58**. Tras completar la elongación de la peptidil-resina **1.57** con los correspondientes aminoácidos y realizar la acetilación y desanclaje de la misma se obtuvo el foldámero **1.47**. La obtención de la peptidil-resina **1.59** dio como resultado, tras elongación con los correspondientes aminoácidos, a las peptidil-resinas **1.60** y **1.61**, las cuales tras acetilación y desanclaje dieron lugar a los foldámeros **1.52** y **1.46**, respectivamente.

En el Esquema 1.14 se detalla la síntesis de los foldámeros **1.49**, **1.50** y **1.53**. En él se puede observar cómo a partir de la peptidil-resina **1.62** se divide la resina para dar lugar a las peptidil-resinas **1.63** y **1.64**. Así, tras la completa elongación de la peptidil-resina **1.63** y su posterior acetilación y desanclaje se obtuvo el foldámero deseado **1.50**. Por otro lado, tras la elongación con los correspondientes aminoácidos de la peptidil-resina **1.65** se obtuvieron las peptidil-resinas **1.66** y **1.67**, que tras la acetilación y desanclaje de las mismas produjo la formación de los foldámeros **1.49** y **1.53**, respectivamente.

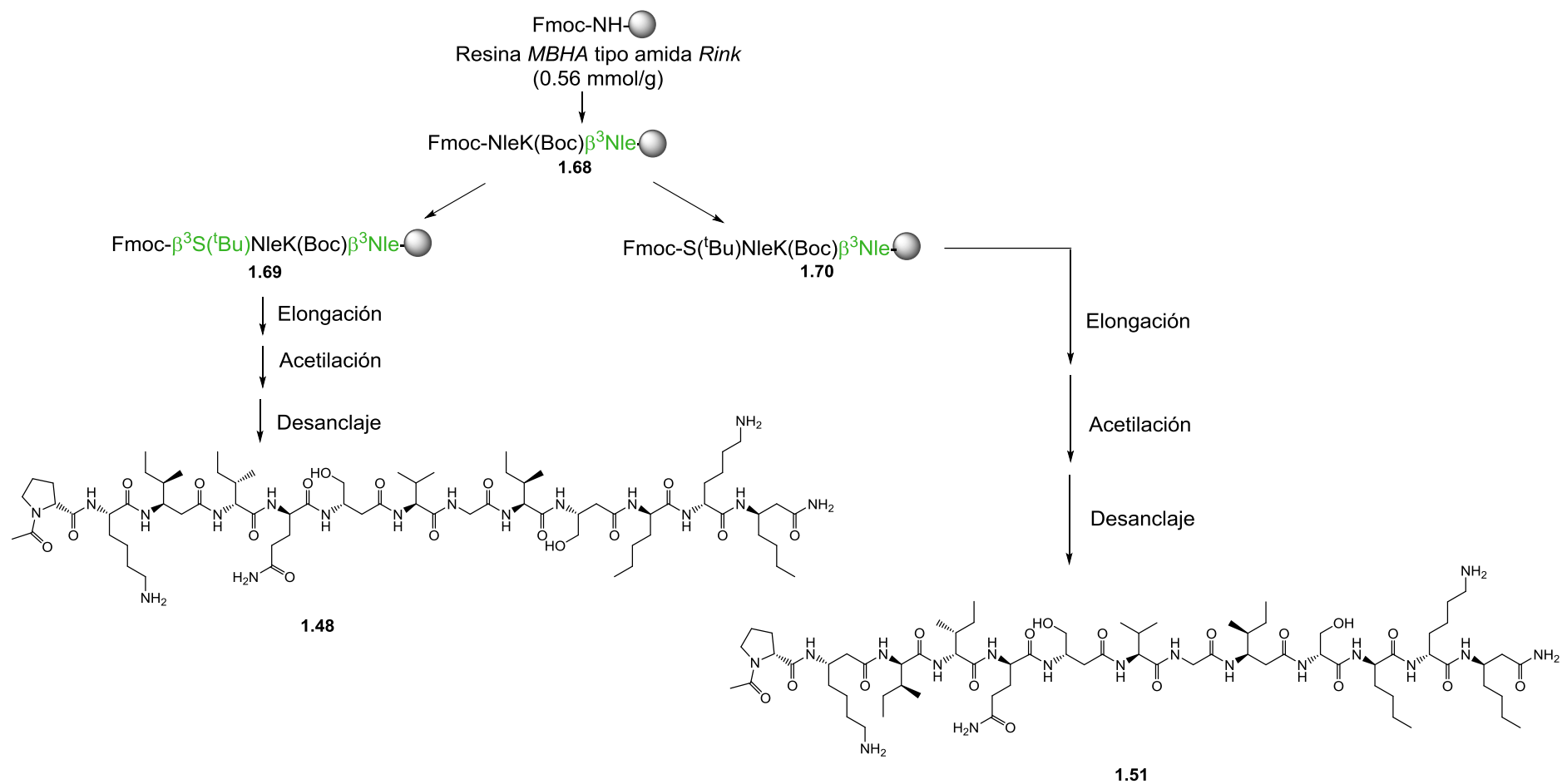
Finalmente, en el Esquema 1.15 se detalla la formación de péptidos **1.48** y **1.51**, los cuales se obtuvieron tras elongación, acetilación y desanclaje de las peptidil-resinas **1.69** y **1.70**, respectivamente.



Esquema 1.13. Síntesis de los foldámeros 1.45, 1.46, 1.47 y 1.52.



Esquema 1.14. Síntesis de los péptidos-α/β 1.49, 1.50 y 1.53.

Esquema 1.15. Síntesis de los péptidos- α/β **1.48** y **1.51**.

1.3.3. Evaluación biológica de los péptidos- α/β

Del mismo modo que para los péptidos lineales y cíclicos, se evaluaron los foldámeros en ensayos enzimáticos de inhibición de la actividad oxidorreductasa y de dimerización. Los valores de CI_{50} obtenidos en estos ensayos se recogen en la Tabla 1.8.

Los resultados de los ensayos de actividad oxidorreductasa de *Li-TryR* muestran que, en general, los péptidos- α/β , que siguen el patrón de sustitución $\alpha\beta\alpha\alpha\beta$ (**1.45-1.51**), resultaron ser inhibidores potentes (1.9 - 11 μ M), con valores de CI_{50} en el rango micromolar del mismo orden que los del péptido prototipo **1.01**. Sin embargo, el péptido- α/β **1.52**, que seguía el patrón $\alpha\alpha\beta$, mostró una actividad inferior al prototipo **1.01**, mientras que los resultados obtenidos para **1.53** no fueron reproducibles.

En cuanto al ensayo de dimerización, todos los foldámeros estudiados, independientemente del patrón de sustitución empleado, se comportaron como inhibidores potentes del proceso de dimerización. Los valores de CI_{50} fueron similares a los del péptido prototipo **1.01** a excepción de los foldámeros **1.48** y **1.51** que mostraron valores de inhibición 6 ó 4 veces inferiores.

Tabla 1.8. Valores de $CI_{50} \pm DE$ (desviación estándar) (μ M) obtenidos en los ensayos inhibición de la actividad oxidorreductasa y del proceso de dimerización para los foldámeros **1.45-1.53** y el péptido lineal de referencia **1.01**.

	Péptidos	CI_{50} act. (μ M)*	CI_{50} dim. (μ M)*
Patrón $\alpha\beta\alpha\alpha\beta$	1.45 Ac-PK β^3 I β^3 Q β^3 S β^3 VGI β^3 SNIeKNle-NH ₂	9.9 \pm 1.6	15.83 \pm 1.6
	1.46 Ac-PKI β^3 I β^3 Q β^3 S β^3 VGIS β^3 NleKNle-NH ₂	3.6 \pm 0.2	11.90 \pm 1.30
	1.47 Ac- β^3 PKI β^3 I β^3 QSV β^3 AI β^3 S β^3 NleKNle-NH ₂	3.1 \pm 1.1	16.07 \pm 0.69
	1.48 Ac-PK β^3 I β^3 Q β^3 SVGI β^3 SNIeK β^3 Nle-NH ₂	3.1 \pm 0.6	44.27 \pm 3.19
	1.49 Ac- β^3 PKII β^3 QSV β^3 AI β^3 SNIe β^3 KNle-NH ₂	1.9 \pm 0.5	14.77 \pm 0.96
	1.50 Ac-P β^3 KII β^3 QSVG β^3 ISNIe β^3 KNle-NH ₂	11.0 \pm 2.6	17.85 \pm 0.96
	1.51 Ac-P β^3 KIIQ β^3 SVG β^3 ISNIeK β^3 Nle-NH ₂	2.4 \pm 0.9	28.83 \pm 18.39
Patrón $\alpha\alpha\beta$	1.52 Ac-PK β^3 I β^3 Q β^3 S β^3 VGIS β^3 NleKNle-NH ₂	21.1 \pm 0.8	11.22 \pm 1.30
	1.53 Ac-PKI β^3 I β^3 QSV β^3 AI β^3 SNIe β^3 KNle-NH ₂	n.r.**	15.86 \pm 1.26
Prototipo	1.01 Ac-PKIIQSVGISNIeKNle-NH ₂	1.50 \pm 0.15	7.04 \pm 0.56

*Concentración inhibitoria necesaria para inhibir al 50% la actividad de la enzima o el 50% de la formación del homodímero. Los experimentos se realizan por triplicado. **Resultado no reproducible.

1.4. Estudios de estabilidad proteolítica

Uno de los objetivos de la síntesis de los peptidomiméticos mencionados en este capítulo era aumentar la resistencia a la proteólisis con respecto a los péptidos lineales. Así, con el fin de evaluar la estabilidad proteolítica de los peptidomiméticos se han realizado estudios de proteólisis comparativos frente a una proteasa de amplio espectro, la proteinasa K, obtenida de fuentes comerciales (Aldrich). En estos estudios se han incluido el péptido lineal con residuos de Nle **1.01**, de mayor estabilidad química que el péptido prototipo **P2**, y los péptidos cíclicos y foldámeros que habían mostrado mejores resultados de actividad.

Siguiendo el procedimiento descrito por S. Gellman¹⁰², se ha determinado la estabilidad frente a proteinasa K en disolución tamponada de TBS (*tris-buffered saline*) a pH = 7.6 (obtenido de fuentes comerciales: Aldrich) a una concentración de 50 μ M de péptido y 10 μ g/mL de proteinasa K. Para ello, se prepararon disoluciones *stock* de 100 μ M de cada uno de los péptidos en TBS con un 10% de DMSO y una disolución *stock* 50 μ g/mL de proteinasa K. Para realizar una curva completa de estabilidad se añadió en un tubo *ependorf* 400 μ L de la disolución 100 μ M del péptido, 240 μ L de TBS y 160 μ L de proteinasa K (50 μ g/mL), con agitación orbital. A continuación, para parar la reacción, se tomaron alícuotas de 50 μ L de esta mezcla sobre una disolución de TFA al 1% en agua/acetonitrilo 1:1 a los tiempos necesarios para realizar la curva en cada uno de los casos. Finalmente se inyectaron en el HPLC 100 μ L de la disolución resultante y se cuantificó el porcentaje de péptido sin hidrolizar a 214 nm. Las curvas se llevaron a cabo por duplicado o por triplicado y los tiempos de vida media se determinaron representando el porcentaje de péptido sin hidrolizar frente al tiempo y ajustando los datos a una curva exponencial utilizando el programa *GraphPad Prism*.¹⁰⁴

Los tiempos de vida media ($t_{1/2}$) obtenidos para los péptidos y peptidomiméticos estudiados se recogen en la Tabla 1.9, donde se puede apreciar que el péptido **1.09**, péptido cíclico con un enlace amida entre las posiciones 3 y 7, presenta un tiempo de vida media dos veces superior a la del péptido lineal **1.01**. El péptido grapado **1.37b**, con un enlace C-C entre las mismas posiciones de la secuencia, incrementa su estabilidad proteolítica, siendo ésta 18 veces superior a la del péptido lineal **1.01**. Del mismo modo, los péptidos cíclicos amida (**1.10**) y grapado (**1.41b**) entre las posiciones 4 y 8 incrementan su estabilidad proteolítica con respecto al péptido lineal **1.01** en 3 y 9 veces, respectivamente.

En el caso de los péptidos- α/β se observan grandes diferencias en los tiempos de vida media en función de la posición en la que se introducen los β^3 -aminoácidos en la secuencia peptídica. Así, los péptidos **1.47** y **1.49** poseen tiempos de vida media muy bajos, similares o incluso inferiores al péptido lineal, mientras que el resto de los foldámeros poseen tiempos de vida media más elevados, siendo el foldámero **1.48** el que presenta una mayor estabilidad frente a la proteinasa K de todos los péptidomiméticos estudiados en este capítulo, con un tiempo de vida media 21 veces superior al péptido lineal **1.01**. De esta manera, se han obtenido péptidos- α/β lineales, más fáciles de sintetizar que los cíclicos y más estables frente a la proteólisis.

Tabla 1.9. Estabilidad frente a proteinasa K de los péptidos y peptidomiméticos estudiados.

Péptidos			$t_{1/2}$ (min)
Péptido lineal	1.01	Ac-PKIIQSVGISNleKNle-NH ₂	23
Péptidos cíclicos amida	1.09	Ac-PK(EIQSK)GISNleKNle-NH ₂	52
	1.10	Ac-PK(EQSVK)ISNleKNle-NH ₂	64
Péptidos cíclicos grapados	1.37b	Ac-PK(AIQSA)GISNleKNle-NH ₂	418
	1.41b	Ac-PK(AQSV A)ISNleKNle-NH ₂	212
Péptidos- α/β	1.46	Ac-PK β^3 IQS β^3 VGIS β^3 NleKNle-NH ₂	215
	1.47	Ac- β^3 PKI β^3 IQSV β^3 AI β^3 NleKNle-NH ₂	23
	1.48	Ac-PK β^3 IIQ β^3 SVGI β^3 SNleK β^3 Nle-NH ₂	486
	1.49	Ac- β^3 PKII β^3 QSV β^3 AI β^3 Nle β^3 KNle-NH ₂	18
	1.50	Ac-P β^3 KII β^3 QSVG β^3 ISNle β^3 KNle-NH ₂	317
	1.51	Ac-P β^3 KIIQ β^3 SVG β^3 ISNleK β^3 Nle-NH ₂	131
	1.52	Ac-PK β^3 IIQS β^3 VGIS β^3 NleKNle-NH ₂	< 15

1.5. Conclusiones

En este capítulo se han estudiado diferentes series de péptidos lineales, péptidos cíclicos y foldámeros con el fin de mejorar tanto la estabilidad química como proteolítica del péptido lineal prototipo **P2** manteniendo o mejorando la actividad del mismo en los ensayos enzimáticos frente a la *Li-TryR*.

➤ Dentro de la Serie 1 se han preparado péptidos lineales químicamente más estables que el prototipo **P2**, portadores de residuos de Nle en lugar de Met en su cadena peptídica. El péptido **1.01** mostró buenos valores (rango micromolar bajo) de inhibición tanto de la actividad oxidorreductasa como de dimerización de *Li-TryR*, siendo elegido como nuevo prototipo para el diseño y síntesis de diferentes tipos de peptidomiméticos.

(a) Se ha determinado la longitud mínima necesaria de estos péptidos lineales para la inhibición de la actividad y la dimerización de la enzima. Así, el péptido **1.05** (9-*mer*) muestra la longitud mínima necesaria para preservar la actividad.

(b) El péptido de 8 aminoácidos **1.06**, carente del residuo de Ile, resultó inactivo en ambos ensayos de actividad, lo que parece indicar la importancia de dicho residuo para la actividad.

➤ En cuanto a la Serie 2, se han obtenido péptidos cíclicos de distinta longitud a través de puentes amida y puentes hidrocarbonados en distintas posiciones de ciclación, que han mostrado una mejor helicidad en disolución así como una mejor estabilidad proteolítica.

(a) La estrategia de ciclación mediante enlaces amida ha resultado más efectiva que mediante puentes hidrocarbonados para la estructuración de los péptidos en disolución.

(b) La longitud y la posición de ciclación en la serie de péptidos cíclicos con puente amida son importantes para la inhibición de la actividad oxidorreductasa y de dimerización de *Li-TryR*. Los péptidos **1.09** y **1.10** (13-*mer*), ciclados entre los residuos 3/7 y 4/8, respectivamente, han mostrado los mejores resultados, con valores de actividad similares a los del prototipo lineal.

(c) La naturaleza del puente en los péptidos cíclicos (amida vs C-C) no influye significativamente en la inhibición de la actividad de la enzima mostrando los péptidos grapados **1.37b** y **1.41b** actividades similares a los péptidos cíclicos amida **1.09** y **1.10**. Sin embargo, el comportamiento en el ensayo de dimerización ha sido

muy diferente; ya que los mencionados péptidos cíclicos amida han resultado ser inhibidores, al igual que el péptido lineal prototipo, mientras que los péptidos grapados son estabilizadores (*enhancers*) del proceso de dimerización.

➤ Respecto a la Serie 3, se ha sintetizado una pequeña quimioteca de foldámeros en los que se han estudiado diferentes patrones de sustitución de los β^3 -aminoácidos. En general, no se han observado diferencias significativas en la inhibición tanto de la actividad como de la dimerización entre ellos, manteniéndose la actividad en todos los casos en el rango micromolar, con valores de CI_{50} similares a los del prototipo.

➤ Los estudios de estabilidad proteolítica frente a proteinasa K (proteasa de amplio espectro) de los péptidos cíclicos más activos, han mostrado que los péptidos amida **1.09** y **1.10** son 2 y 3 veces más estables que el péptido lineal **1.01**, respectivamente. Los péptidos grapados **1.37b** y **1.41b** son a su vez 18 y 9 veces más estables que éste. Entre los foldámeros se observa una gran variación en los tiempos de vida media, en estos estudios, dependiendo de la posición del residuo β^3 , observándose tiempos de vida media desde similares al péptido prototipo hasta cerca de 20 veces superiores.

Por tanto, en este capítulo se han obtenido distintos peptidomiméticos que han mejorado significativamente la estabilidad proteolítica del péptido lineal prototipo, especialmente en el caso de los péptidos grapados y de los foldámeros, manteniendo una potencia inhibitoria en los ensayos enzimáticos similar a éste.

Estos resultados prometedores nos hicieron plantearnos la evaluación de los compuestos en ensayos en cultivo celular frente a parásitos, especialmente en el caso de los péptidos grapados que presentarían “a priori” una mayor permeabilidad celular que el péptido lineal prototipo. Los resultados de dichas evaluaciones se comentarán en el siguiente Capítulo de esta Tesis Doctoral.

1.6. Bibliografía

1. Sánchez, P. A. Interacciones proteína-proteína como diana terapéutica en la transcriptasa inversa del VIH-1 y en la tripanotión reductasa de *Leishmania infantum*. Tesis Doctoral. **2013**. Universidad Complutense de Madrid.
2. Pelay-Gimeno, M.; Glas, A.; Koch, O.; Grossmann, T. N. Structure-based design of inhibitors of protein-protein interactions: mimicking peptide binding epitopes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 8896-8927.
3. Randhawa, Z. I.; Witkowska, H. E.; Cone, J.; Wilkins, J. A.; Hughes, P.; Yamanishi, K.; Yasuda, S.; Masui, Y.; Arthur, P. Incorporation of Norleucine at Methionine Positions in Recombinant Human Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF, 4-153) Expressed in *Escherichia coli*: Structural Analysis. *Biochemistry*, **1994**, *33*, 4352-4362.
4. Marder, O.; Shvo, Y.; Albericio, F. HCTU and TCTU. New coupling reagents: development and industrial aspects. *Chim. Oggi.* **2002**, *20*, 37-41.
5. Marder, O.; Albericio, F. Industrial application of coupling reagents in peptides. *Chim. Oggi.* **2003**, *21*, 35-40.
6. El-Faham, A.; Albericio, F. Peptide coupling reagents, more than a letter soup. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557-6602.
7. Hood, C. A.; Fuentes, G.; Patel, H.; Page, K.; Menakuru, M.; Park, J. H. Fast conventional Fmoc solid-phase peptide synthesis with HCTU. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 97-101.
8. Pedersen, S. L.; Pernille Tofteng, A.; Malik, L.; Jensen, K. J. Microwave heating in solid-phase peptide synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1826-1844.
9. Toro, M.A.; Sánchez-Murcia, P.A.; Moreno, D.; Ruiz-Santaquiteria, M.; Alzate, J.F.; Negri, A.; Camarasa, M.J.; Gago, F.; Velázquez, S.; Jiménez-Ruiz, A. Probing the Dimerization Interface of *Leishmania infantum* Trypanothione Reductase with Site-Directed Mutagenesis and Short Peptides. *ChemBioChem*, **2013**, *14*, 1212-1217.
10. Hamilton, C., Saravanamuthu, A., Eggleston, I., Fairlamb, A. Ellman's-reagent-mediated regeneration of trypanothione in situ: substrate-economical microplate and time-dependent inhibition assays for trypanothione reductase. *Biochem. J.* **2003**, *369*, 529-537.
11. Sluis Cremer N, Hamamouch N, San Félix A, Velázquez S, Balzarini J, Camarasa M. J. Structure-activity relationships of [2',5'-bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-beta-D-ribofuranosyl]- 3'-

spiro-5'-(4'-amino-1',2'-oxathiole-2',2'-dioxide)thymine derivatives as inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase dimerization. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4834-4841.

12. Lau, Y. H.; Andrade, P.; Wu, Y.; Spring, D. R. Peptide stapling techniques based on different macrocyclisation chemistries. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 91-102.

13. Azzarito, V.; Long, K.; Murphy, N. S.; Wilson, A. J. Inhibition of α -helix-mediated protein-protein interactions using designed molecules. *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 161-173.

14. White, C. J.; Yudin, A. K. Contemporary strategies for peptide macrocyclization. *Nat. Chem.*, **2011**, *3*, 509-524.

15. Marqusee, S.; Baldwin, R. L. Helix stabilization by Glu-...Lys+ salt bridges in short peptides of *de novo* design. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 8898-8902.

16. Huyghues-Despointes, B. M. P.; Martin Scholtz, J.; Baldwin, R. L., Helical peptides with three pairs of Asp-Arg and Glu-Arg residues in different orientations and spacings. *Protein Sci.* **1993**, *2*, 80-85.

17. Scholtz, J. M.; Qian, H.; Robbins, V. H.; Baldwin, R. L., The energetics of ion-pair and hydrogen-bonding interactions in a helical peptide. *Biochemistry* **1993**, *32*, 9668-9676.

18. Phelan, J. C. ; Skelton, N. J.; Braisted, A. C.; McDowell, R. S., A General Method for Constraining Short Peptides to an α -Helical Conformation. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 455-460.

19. Pecuh, M. W.; Hamilton, A. D., Peptide and Protein Recognition by Designed Molecules. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2479-2494.

20. Vila, J. A.; Ripoll, D. R.; Scheraga, H. A., Physical reasons for the unusual α -helix stabilization afforded by charged or neutral polar residues in alanine-rich peptides. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 13075-13079.

21. Olson, C. A.; Shi, Z.; Kallenbach, N. R. Polar Interactions with Aromatic Side Chains in α -Helical Peptides: $\text{CH}\cdots\text{O}$ H-Bonding and Cation- π Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6451-6452.

22. Tsou, L. K.; Tatko, C. D.; Waters, M. L., Simple Cation- π Interaction between a Phenyl Ring and a Protonated Amine Stabilizes an α -Helix in Water. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14917-14921.

23. Lyu, P.; Liff, M.; Marky, L.; Kallenbach, N., Side chain contributions to the stability of alpha-helical structure in peptides. *Science* **1990**, *250*, 669-673.
24. Lyu, P. C.; Sherman, J. C.; Chen, A.; Kallenbach, N. R., Alpha-helix stabilization by natural and unnatural amino acids with alkyl side chains. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 5317-5320.
25. Albert, J. S.; Hamilton, A. D. Stabilization of Helical Domains in Short Peptides Using Hydrophobic Interactions. *Biochemistry* **1995**, *34*, 984-990.
26. Beyer, R. L.; Hoang, H. N.; Appleton, T. G.; Fairlie, D. P., Metal Clips Induce Folding of a Short Unstructured Peptide into an α -Helix via Turn Conformations in Water. Kinetic versus Thermodynamic Products. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15096-15105.
27. Ghadiri, M. R.; Choi, C., Secondary structure nucleation in peptides. Transition metal ion stabilized α -helices. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1630-1632.
28. Ghadiri, M. R.; Fernholz, A. K., Peptide architecture. Design of stable α -helical metalloptides via a novel exchange-inert ruthenium(III) complex. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9633-9635.
29. Kelso, M. J.; Beyer, R. L.; Hoang, H. N.; Lakdawala, A. S.; Snyder, J. P.; Oliver, W. V.; Robertson, T. A.; Appleton, T. G.; Fairlie, D. P., α -Turn Mimetics: Short Peptide α -Helices Composed of Cyclic Metallopentapeptide Modules. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4828-4842.
30. Kelso, M. J.; Hoang, H. N.; Appleton, T. G.; Fairlie, D. P., The First Solution Structure of a Single α -Helical Turn. A Pentapeptide α -Helix Stabilized by a Metal Clip. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10488-10489.
31. Jackson, D. Y.; King, D. S.; Chmielewski, J.; Singh, S.; Schultz, P. G., General approach to the synthesis of short α -helical peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9391-9392.
32. Taylor, J. W. The synthesis and study of side-chain lactam bridges peptides. *Pept. Sci.* **2002**, *66*, 49-75.
33. Der Torossian Torres, M.; Farias Silva, A.; de Souza Silva, L.; Acácia de Sá Pinheiro, A.; Oliveira, V. X. Jr. Angiotensin II restricted analogs with biological activity in the erythrocytic cycle of *Plasmodium falciparum*. *J. Pept. Sci.* **2015**, *21*, 24-28.

34. Aihara, K.; Inokuma, T.; Komiya, C.; Shigenaga, A.; Otaka, A. Synthesis of lactam-bridged cyclic peptides using sequential olefin metathesis and diimide reduction reactions. *Tetr.* **2015**, *71*, 4183-4191.

35. Cantel, S.; Isaad Ale, C.; Scrima, M.; Levy, J. J.; DiMarchi, R. D.; Rovero, P.; Halperin, J. A.; D'Ursi, A. M.; Papini, A. M.; Chorev, M., Synthesis and conformational analysis of a cyclic peptide obtained via i to i+4 intramolecular side-chain to side-chain azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5663-5674.

36. Jacobsen, Ø.; Maekawa, H.; Ge, N. H.; Görbitz, C. H.; Rongved, P.; Ottersen, O. P.; Amiry-Moghaddam, M.; Klaveness, J. Stapling of a 3₁₀-Helix with Click Chemistry. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 1228-1238.

37. Kawamoto, S. A.; Coleska, A.; Ran, X.; Yi, H.; Yang, C.-Y.; Wang, S., Design of Triazole-Stapled BCL9 α -Helical Peptides to Target the β -Catenin/B-Cell CLL/lymphoma 9 (BCL9) Protein-Protein Interaction. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1137-1146.

38. Felix, A. M.; Heimer, E. P.; Wang, C. T.; Lambros, T. J.; Fournier, A.; Mowles, T. F.; Maines, S.; Campbell, R. M.; Wegrzynski, B. B.; Toome, V.; Fry, D.; Madison, V. S. Synthesis, biological activity and conformational analysis of cyclic GRF analogs. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1988**, *32*, 441-454.

39. Mills, N. L.; Daugherty, M. D.; Frankel, A. d.; Guy, R. K. An α -Helical Peptidomimetic Inhibitor of the HIV-1 Rev-RRE Interaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3496-3497.

40. Leduc, A. M.; Trent, J. O.; Wittliff, J. L.; Bramlett, K. S.; Briggs, S. L.; Chirgadze, N. Y.; Wang, Y.; Burris, T. P.; Spatola, A. F. Helix-stabilized cyclic peptides as selective inhibitors of steroid receptor-coactivator interactions. *PNAS.* **2003**, *100*, 11273-11278.

41. Henchey, L. K., Jochim, A. L., Arora, P. S. Contemporary strategies for the stabilization of peptides in the alpha-helical conformation. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2008**, *12*, 692-697, y citas aquí recogidas.

42. Yu, C.; Taylor, J. W. Synthesis and Study of Peptides with Semirigid i and i+7 Side-chain Bridges Designed for α -Helix Stabilization. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 161-175.

43. Ösapay, G.; Taylor, J. W. Multicyclic Polypeptide Model Compounds. 2. Synthesis and Conformational Properties of a Highly α -Helical Uncosapeptide Constrained by Three Side-Chain to Side-Chain Lactam Bridges. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6966-6973.

44. Phelan, J. C.; Skelton, N. J.; Braisted, A. C.; McDowell, R.S. A General Method for Constraining Short Peptides to an α -Helical Conformation. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 455-460.
45. Kutchukian, P. S.; Yang, J. S.; Verdine, G. L.; Shakhnovich, E. I., All-Atom Model for Stabilization of α -Helical Structure in Peptides by Hydrocarbon Staples. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4622-4627.
46. Previamente, Grubbs y colaboradores habían descrito el empleo de la reacción de RCM para el entrecruzamiento entre residuos de O-alil Ser, separados por una vuelta de hélice (i, i+4). (a) Blackwell, H.E.; Grubbs, R.H. Highly Efficient Synthesis of Covalently Cross-Linked Peptide Helices by Ring-Closing Metathesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3281-3284.
47. Blackwell, H.E.; Sadowsky, R. J. Howard, J. N. Sampson, J. A. Chao, W. E. Steinmetz, D. J. O'Leary, R. H. Grubbs. Ring-Closing Metathesis of Olefinic Peptides: Design, Synthesis, and Structural Characterization of Macrocyclic Helical Peptides *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5291-5302.
48. Schafmeister, C. E.; Po, J.; Verdine, G. L., An All-Hydrocarbon Cross-Linking System for Enhancing the Helicity and Metabolic Stability of Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5891-5892.
49. Kim, Y.-W.; Kutchukian, P. S.; Verdine, G. L., Introduction of All-Hydrocarbon i,i+3 Staples into α -Helices via Ring-Closing Olefin Metathesis. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3046-3049.
50. Bernal, F.; Tyler, A. F.; Korsmeyer, S. J.; Walensky, L. D.; Verdine, G. L., Reactivation of the p53 Tumor Suppressor Pathway by a Stapled p53 Peptide. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2456-2457.
51. Gavathiotis, E.; Suzuki, M.; Davis, M. L.; Pitter, K.; Bird, G. H.; Katz, S. G.; Tu, H.-C.; Kim, H.; Cheng, E. H. Y.; Tjandra, N.; Walensky, L. D., BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature*. **2008**, *455*, 1076-1081.
52. Oh, K. J.; Barbuto, S.; Pitter, K.; Morash, J.; Walensky, L. D.; Korsmeyer, S. J., A membrane-targeted BID BCL-2 homology 3 peptide is sufficient for high potency activation of BAX in vitro. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 36999-37008.
53. Walensky, L. D.; Pitter, K.; Morash, J.; Oh, K. J.; Barbuto, S.; Fisher, J.; Smith, E.; Verdine, G. L.; Korsmeyer, S. J., A stapled BID BH3 helix directly binds and activates BAX. *Mol. Cell.* **2006**, *24*, 199-210.

54. Walensky, L. D., BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death. *Cell Death Differ.* **2006**, *13*, 1339-1350.
55. Stewart, M. L.; Fire, E.; Keating, A. E.; Walensky, L. D., The MCL-1 BH3 helix is an exclusive MCL-1 inhibitor and apoptosis sensitizer. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 595-601.
56. Verdine, G. L.; Hilinski, G. J., Chapter one - Stapled Peptides for Intracellular Drug Targets. In *Methods Enzymol.*, Wittrup, K. D.; Gregory, L. V., Eds. Academic Press: 2012; Vol. Volume 503, pp 3-33.
57. Walensky, L. D.; Bird, G. H. Hydrocarbon stapled-peptides: principles, practice, and progress. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 6275-6288.
58. Grieco, P.; Gitu, P. M.; Hruby, V. J. Preparation of 'side-chain-to-side-chain' cyclic peptides by Allyl and Alloc strategy: potential for library synthesis. *J. Peptide Res.* **2001**, *57*, 250-256.
59. Murage, E. N.; Gao, G.; Bisello, A.; Ahn, J. M. Development of potent glucagon-like peptide-1 agonists with high enzyme stability via introduction of multiple lactam bridge. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6412-6420.
60. Zhu, J.; Marchant, R. E. Solid-phase synthesis of tailed cyclic RGD peptides using glutamic acid: unexpected glutarimide formation. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 690-696.
61. Robinson, A. J.; Elaridi, J.; Van Lierop, B. J.; Mujcinovic, S.; Jackson, W. R., Microwave-assisted RCM for the synthesis of carbocyclic peptides. *J. Pept. Sci.* **2007**, *13*, 280-285.
62. Illesinghe, J.; Gou, C. X.; Garland, R.; Ahmed, A.; van Lierop, B.; Elaridi, J.; Jackson, R. F. W.; Robert, A., Metathesis assisted of cyclic peptides. *Chem. Commun.* **2009**, *3*, 295-297.
63. Sánchez-Murcia.; P. A.; Ruiz-Santaquiteria, M.; Toro, M. A.; de Lucio, H.; Jiménez, M. A.; Gago, F.; Jiménez Ruiz, A.; Camarasa, M. J.; Velázquez, S. Comparison of hydrocarbon- and lactam-bridged cyclic peptides as dimerization inhibitors of *Leishmania infantum* trypanothione reductase. *R.S.C. Advances*, **2015**, *5*, 55784-55794.
64. Velluz, L.; Legrand, M.; Grosjean, M., Optical Circular Dichroism: Principles, Measurements, and Applications. 1965.
65. Beychok, S., Circular dichroism of biological macromolecules. *Science* **1966**, *154*, 1288-1299.

66. Venyaminov, S. Y.; Yang, J. T., Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules. 1996.
67. Roccatano, D.; Colombo, G.; Fioroni, M.; Mark, A. E., Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: A molecular dynamics study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 12179-12184.
68. Buck, M., Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins. *Q. Rev. Biophys.* **1998**, *31*, 297-355.
69. Luo, P.; Baldwin, R. L., Mechanism of Helix Induction by Trifluoroethanol: A Framework for Extrapolating the Helix-Forming Properties of Peptides from Trifluoroethanol/Water Mixtures Back to Water. *Biochemistry* **1997**, *36*, 8413-8421.
70. Shepherd, N. E.; Hoang, H. N.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P., Single Turn Peptide Alpha Helices with Exceptional Stability in Water. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2974-2983.
71. Case, D. A.; Berryman, J. T.; Betz, R. M.; Cerutti, D. S.; Cheatham III, T. E.; Darden, T. A.; Duke, R. E.; Giese, T. J.; Gohlke, H.; Goetz, A. W.; Homeyer, N.; Izadi, S.; Janowski, P.; Kaus, J.; Kovalenko, A.; Lee, T. S.; LeGrand, S.; Li, P.; Luchko, T.; Luo, R.; Madej, B.; Merz, K. M.; Monard, G.; Needham, P.; Nguyen, H.; Nguyen, H. T.; Omelyan, I.; Onufriev, A.; Roe, D. R.; Roitberg, A.; Salomon-Ferrer, R.; Simmerling, C. L.; Smith, W.; Swails, J.; Walker, R. C.; Wang, J.; Wolf, R. M.; Wu, X.; York, D. M.; Kollman, P. A. (2015), AMBER 2015, University of California, San Francisco.
72. Aqvist, J., Ion-water interaction potentials derived from free energy perturbation simulations. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 8021-8024.
73. Tachedjian, G.; Goff, S.P. The effect of NNRTIs on HIV reverse transcriptase dimerization. *Curr. Opin. Invest. Drugs.* **2003**, *4*, 966-973.
74. Tachedjian, G.; Orlova, M.; Sarafianos, S.G.; Arnold, E.; Goff, S.P. Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors are chemical enhancers of dimerization of the HIV type 1 reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 7188-7193.
75. Giordanetto, F.; Schäfer A.; Ottmann, C. Stabilization of protein–protein interactions by small molecules. *Drug Discov. Today.* **2014**, *19*, 1812-1821.
76. Milroy, L.G.; Grossmann, T. N.; Hennig, S.; Brunsveld, L.; Ottmann, C. Modulators of protein-protein interactions. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4695-4748.

77. Milroy, L. G.; Bartel, M.; Henen, M. A.; Leysen, S.; Adriaans, J. M.; Brunsveld, L.; Landrieu, I.; Ottmann, C. Stabilizer-Guided Inhibition of Protein–Protein Interactions. *Angew. Chem Int. Ed.* **2015**, *54*, 1-6.

78. Gellman, S. H. Foldamers: A manifesto. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 173-180.

79. Frackenhohl, J.; Arvidsson, P. I.; Schreiber, J. V.; Seebach, D. The Outstanding Biological Stability of β - and γ -Peptides toward Proteolytic Enzymes: An In Vitro Investigation with Fifteen Peptidases. *ChemBioChem.* **2001**, *2*, 445-455.

80. Wiegand, H.; Wirz, B.; Schweitzer, A.; Camenisch, G. P.; Rodríguez Pérez, M. I.; Gross, G.; Woessner, R.; Voges, R.; Arvidsson, P. I., Frackenhohl, J.; Seebach, D. The Outstanding Metabolic Stability of a ^{14}C -Labeled β -Nonapeptide in Rats – *in vitro* and *in vivo* Pharmacokinetic Studies. *Biopharm. Drug Dispos.* **2002**, *23*, 251-262.

81. Fahs, S.; Patil-Sen, Y.; Snape, T. J. Foldamers as Anticancer Therapeutics: Targeting Protein–Protein Interactions and the Cell Membrane. *ChemBioChem.* **2015**, *16*, 1840-1853.

82. Prabhakaran, P.; Barnard, A.; Murphy, N. S.; Kilner, C. A.; Edwards, T. A.; Wilson, A. J. Aromatic Oligoamide Foldamers with a “Wet Edge” as Inhibitors of the α -Helix-Mediated p53–hDM2 Protein–Protein Interaction. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 3504-3512.

83. Cheng, R. P.; Gellman, S. H.; DeGrado, W. F. β -Peptides: from structure to function. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219-3232.

84. Seebach, D.; Gardiner, J. β -Peptidics peptidomimetics. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1366-1375.

85. Checco, J. W.; Lee, E. F.; Evangelista, M.; Sleebs, N. J.; Rogers, K.; Pettikiriachchi, A.; Kershaw, N. J.; Eddinger, G. A.; Belair, D. G.; Wilson, J. L.; Eller, C. H.; Raines, R. T.; Murphy, W. L.; Smith, B. J.; Gellman, S. H.; Fairlie, W. D. α/β -Peptide Foldamers Targeting Intracellular Protein–Protein Interactions with Activity in Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 11365-11375.

86. De Pol, S.; Zorn, C.; Klein, C. D.; Zerbe, O.; Reiser, O. Surprisingly Stable Helical Conformations in α/β -Peptides by Incorporation of *cis*- β -Aminocyclopropane Carboxylic Acids. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 511-514.

87. Sharma, G. V. M.; Nagendar, P.; Jayaprakash, P.; Radha Krishna, P.; Ramakrishna, K. V. S.; Kunwar, A. C. 9/11 Mixed Helices in α/β Peptides Derived from C-Linked Carbo- β -Amino Acid and L-Ala Repeats. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5878-5882.
88. Schmitt, M. A.; Choi, S. H.; Guzei, I. A.; Gellman, S. H. New Helical Foldamers: Heterogeneous Backbones with 1:2 and 2:1 α/β -Amino Acid Residue Patterns. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4538-4539.
89. Simon, R. J.; Kania, R. S.; Zuckermann, R. N.; Huebner, V. D.; Jewell, D. A.; Banville, S.; Ng, S.; Wang, L.; Rosenberg, S.; Marlowe, C. K. Peptoids: A modular approach to drug discovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1992**, *89*, 9367-9371.
90. Kessler, H. Peptoids—A New Approach to the Development of Pharmaceuticals. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 543-544.
91. Zuckermann, R. N. Peptoid origins. *Biopolymers.* **2011**, *96*, 545-555.
92. Laursen, J. S.; Engel-Andreasen, J.; Olsen, C. A. β -Peptoid foldamers at last. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 2696-2704.
93. Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Klein, D. A.; Powell, D. R.; Huang, X.; Barchi, J. J.; Gellman, S. H. Residue-based control of helix shape in β -peptide oligomers. *Nature.* **1997**, *387*, 381-384.
94. LePlae, P. R.; Fisk, J. D.; Porter, E. A.; Weisblum, B.; Gellman, S. H. Tolerance of Acyclic Residues in the β -Peptide 12-Helix: Access to Diverse Side-Chain Arrays for Biological Applications. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6820-6821.
95. Arvidsson, P. I.; Rueping, M.; Seebach, D. Design, machine synthesis, and NMR-solution structure of a β -heptapeptide forming a salt-bridge stabilised 3_{14} -helix in methanol and in water. *Chem. Commun.* **2001**, 649-650.
96. Seebach, D.; Schreiber, J. V.; Arvidsson, P. I.; Frackenpohl, J. The Miraculous CD Spectra (and Secondary Structures?) of β -Peptides as They Grow Longer. *Helv. Chim. Acta.* **2001**, *84*, 271-279.
97. Cheng, R. P.; DeGrado, W. F. Long-Range Interactions Stabilize the Fold of a Non-natural Oligomer. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11564-11565.

98. Pils, L. K.; Reiser, O. α/β -Peptide foldamers: state of the art. *Amino Acids*. **2011**, *41*, 709-718.
99. Hayen, A.; Schmitt, M. A.; Ngassa, F. N.; Thomasson, K. A.; Gellman, S. H. Two Helical Conformations from a Single Foldamer Backbone: "Split Personality" in Short α/β -Peptides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 505-510.
100. Horne, W. S.; Price, J. L.; Gellman, S. H. Interplay among side chain sequence, backbone composition, and residue rigidification in polypeptide folding and assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 9151-9156.
101. Horne, W. S.; Boersma, M. D.; Windsor, M. A.; Gellman, S. H. Sequence-Based Design of α/β -Peptide Foldamers That Mimic BH3 Domains. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2853-2856.
102. Boersma, M. D.; Haase, H. S.; Peterson-Kaufman, K. J.; Lee, E. F.; Clarke, O. B.; Colman, P. M.; Smith, B. J.; Horne, W. S.; Fairlie, W. D.; Gellman, S. H. Evaluation of diverse alpha/beta-backbone patterns for functional alpha-helix mimicry: analogues of the Bim BH3 domain. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 315-323.
103. Edwards, T.; Wilson, A. J. Helix-mediated protein-protein interactions as targets for intervention using foldamers. *Amino Acids*. **2011**, *41*, 743-754.
104. URL: <http://www.graphpad.com/demos/>

CAPÍTULO 2: CONJUGADOS DE PÉPTIDOS Y PEPTIDOMIMÉTICOS CON SONDAS FLUORESCENTES Y/O PÉPTIDOS DE PENETRACIÓN CELULAR

2.1. Evaluación *in vitro* de la actividad leishmanicida y citotóxica de los péptidos lineales, péptidos cíclicos y foldámeros más representativos

Hasta este punto hemos descrito péptidos lineales, péptidos cíclicos y foldámeros capaces de inhibir la dimerización y la actividad enzimática *in vitro* de la TryR de *L. infantum*, una enzima clave en la supervivencia del parásito. Sin embargo, desconocemos cuál será el comportamiento de estos inhibidores en un modelo biológico. Así, en este capítulo se recogen los resultados de la evaluación *in vitro* de la actividad leishmanicida y citotóxica de los péptidos lineales, de los péptidos cíclicos y de los foldámeros más representativos de cada una de las series estudiadas. Como péptidos lineales se eligieron el péptido **1.01** (13-*mer*), que había mostrado una actividad similar y una mayor estabilidad química que el péptido prototipo **P2** inicial (que resultó inestable), y el péptido truncado **1.05** (9-*mer*) que representaba el péptido con la menor longitud necesaria para la actividad. Dentro de la serie de péptidos cíclicos se seleccionaron los péptidos con puentes amida **1.09**, **1.10** y **1.12** que habían mostrado los mejores resultados de inhibición, tanto en los ensayos de actividad como de dimerización, y el isómero mayoritario del péptido grapado **1.37b** que había resultado ser 18 veces más estable que el péptido lineal **1.01** en los ensayos proteolíticos de estabilidad. En cuanto a la serie de los foldámeros (péptidos- α,β), se ensayaron los compuestos **1.46**, **1.48**, **1.50** y **1.51** que, manteniendo unos buenos valores de inhibición en los ensayos enzimáticos de actividad y de dimerización, mejoraban su estabilidad proteolítica con respecto al péptido lineal de referencia.

Todos estos ensayos han sido llevados a cabo en el laboratorio del Prof. Antonio Jiménez de la Universidad de Alcalá.

Tal y como se mencionó en la Introducción, el ciclo de vida del parásito *Leishmania* es complejo, y en él se pueden diferenciar dos fases: (1) una etapa extracelular dentro de un huésped invertebrado (flebótomo), donde el parásito presenta una morfología promastigote y (2) una intracelular dentro del huésped vertebrado, donde presenta una morfología amastigote.^{1,2} Así, los ensayos de actividad leishmanicida de los compuestos se realizaron, a una concentración de 25 μ M, frente a cultivos celulares de promastigotes y amastigotes axénicos de *L. infantum*. La evaluación de la citotoxicidad se llevó a cabo en la línea celular humana THP-1 (monocitos de leucemia humana) la cual ha sido ampliamente utilizada para estudiar funciones monocito/macrófagos, mecanismos y transporte de fármacos, entre otros.³

CAPÍTULO 2

Los resultados de estos ensayos se recogen en la Tabla 2.1. Como puede observarse, ninguno de los compuestos evaluados ejerce una inhibición en el crecimiento de los parásitos superior al 50% a dicha concentración (25 μ M) ni frente a promastigotes ni a amastigotes. Asimismo, ninguno de los compuestos mostró citotoxicidad frente a las células humanas THP-1.

Tabla 2.1. Evaluación *in vitro* de los compuestos más representativos frente a promastigotes y amastigotes de *L. Infantum* y frente a células humanas THP-1.

Péptidos		CE ₅₀ promastigotes (μ M)*	CE ₅₀ amastigotes (μ M)*	CE ₅₀ THP-1 (μ M)*
Péptidos lineales	1.01	Ac-PKIIQSVGISNleKNle-NH ₂	> 25	> 25
	1.05	Ac-PKIIQSVGI-NH ₂	> 25	> 25
Péptidos cíclicos amida	1.09	Ac-PK(EIQSK)GISNleKNle-NH ₂	> 25	> 25
	1.10	Ac-PKI(EQSVK)ISNleKNle-NH ₂	> 25	> 25
	1.12	Ac-PKIIQSV(EISNleK)Nle-NH ₂	> 25	> 25
Péptido cíclico grapado	1.37b	Ac-PK(AIQSA)GISNleKNle-NH ₂	> 25	> 25
Foldámeros	1.46	Ac-PKI β^3 IQS β^3 VGIS β^3 NleKNle-NH ₂	> 25	> 25
	1.48	Ac-PK β^3 IIQ β^3 SVGI β^3 SNleK β^3 Nle-NH ₂	> 25	> 25
	1.50	Ac-P β^3 KII β^3 QSVG β^3 ISNle β^3 KNle-NH ₂	> 25	> 25
	1.51	Ac-P β^3 KIIQ β^3 SVG β^3 ISNleK β^3 Nle-NH ₂	> 25	> 25

*CE₅₀ es la concentración de compuesto que causa una disminución del 50% de la concentración de los parásitos o de las células humanas

Por tanto, se puede concluir que los compuestos resultaron inocuos tanto frente a los parásitos en su forma promastigote y amastigote, como frente a monocitos humanos THP-1. Una de las posibles causas de esta falta de actividad *in vitro* podría deberse a que los péptidos y los peptidomiméticos ensayados no sean capaces de atravesar la membrana celular del parásito, incluido el péptido grapado **1.37b**, que podría “a priori” haber mejorado la permeabilidad celular. Con el fin de estudiar esta posibilidad, a continuación, nos planteamos la introducción de sondas fluorescentes en algunos de estos compuestos que nos permitieran llevar a cabo estudios de internalización mediante microscopía confocal.

2.2. Estudios de internalización mediante microscopía confocal de los compuestos marcados con sondas fluorescentes

Para la síntesis de los compuestos marcados, nos planteamos la introducción de la sonda fluorescente, mediante una unión covalente, en algunos de los péptidos y peptidomiméticos más representativos de las series estudiadas.

Como sonda fluorescente elegimos el 5-isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Figura 2.1), que permite la preparación de compuestos con sondas, que en el microscopio confocal UV-vis se ve de color verde ($\lambda = 525$ nm).

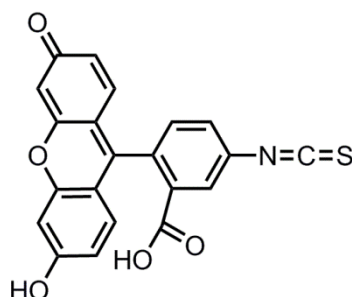


Figura 2.1. Estructura del 5-isotiocianato de fluoresceína empleado como sonda fluorescente.

El grupo isotiocianato permite la reacción con grupos aminos libres. La unión covalente de la sonda fluorescente al extremo *N*-terminal del péptido se realizó a través de un espaciador de polietilenglicol (PEG) para favorecer la solubilidad en agua de los compuestos. En la Figura 2.2 se recoge la fórmula general de los análogos fluorescentes diseñados.

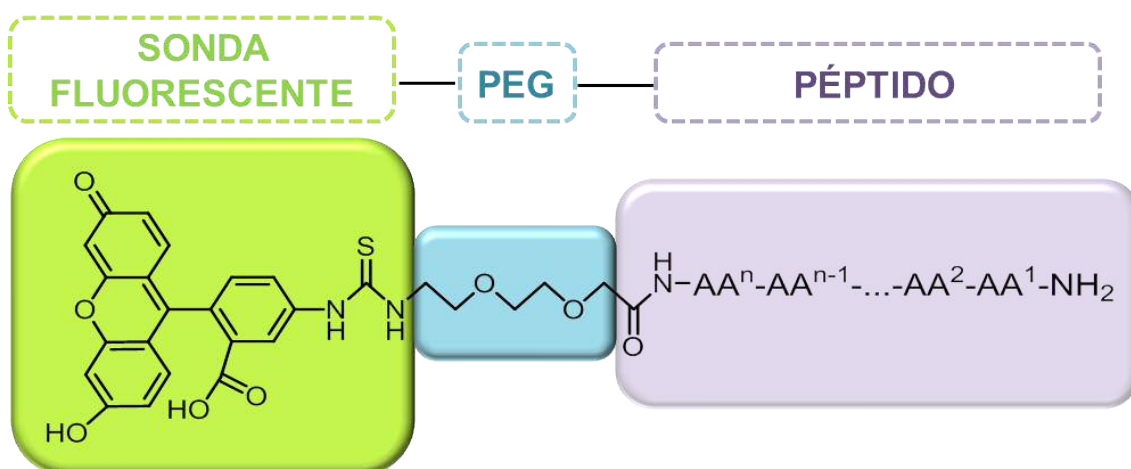


Figura 2.2. Fórmula general de los compuestos marcados con FITC como sonda fluorescente.

En concreto nos planteamos el marcaje con fluoresceína del péptido lineal **1.01**, más estable químicamente que el péptido prototipo **P2** inicial, los péptidos cíclicos con puente amida **1.09** y con puente hidrocarbonado **1.37b**, y el péptido- α,β **1.48**, que habían mostrado una mayor estabilidad en los ensayos de proteólisis frente a proteinasa K. En la Figura 2.3 se recogen los compuestos propuestos **2.01-2.04**.

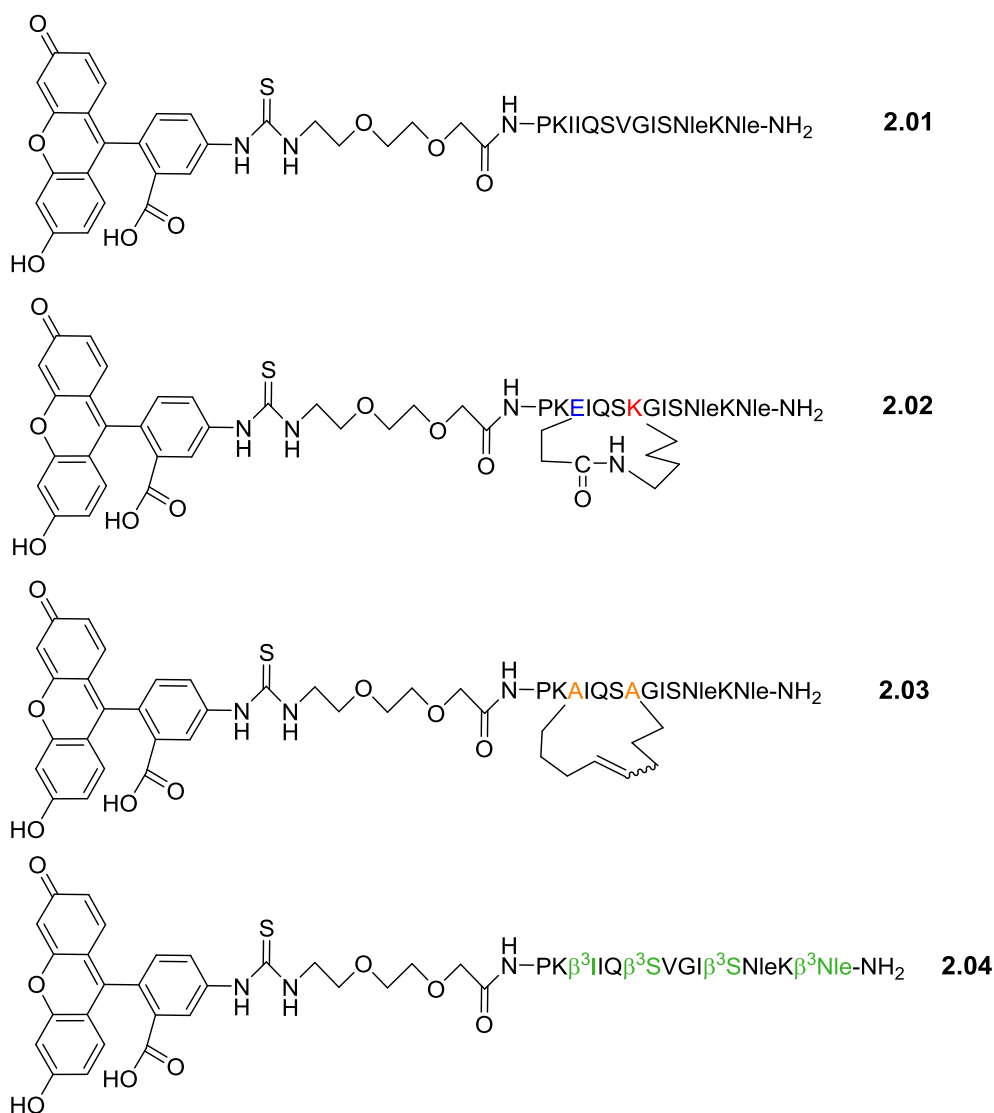
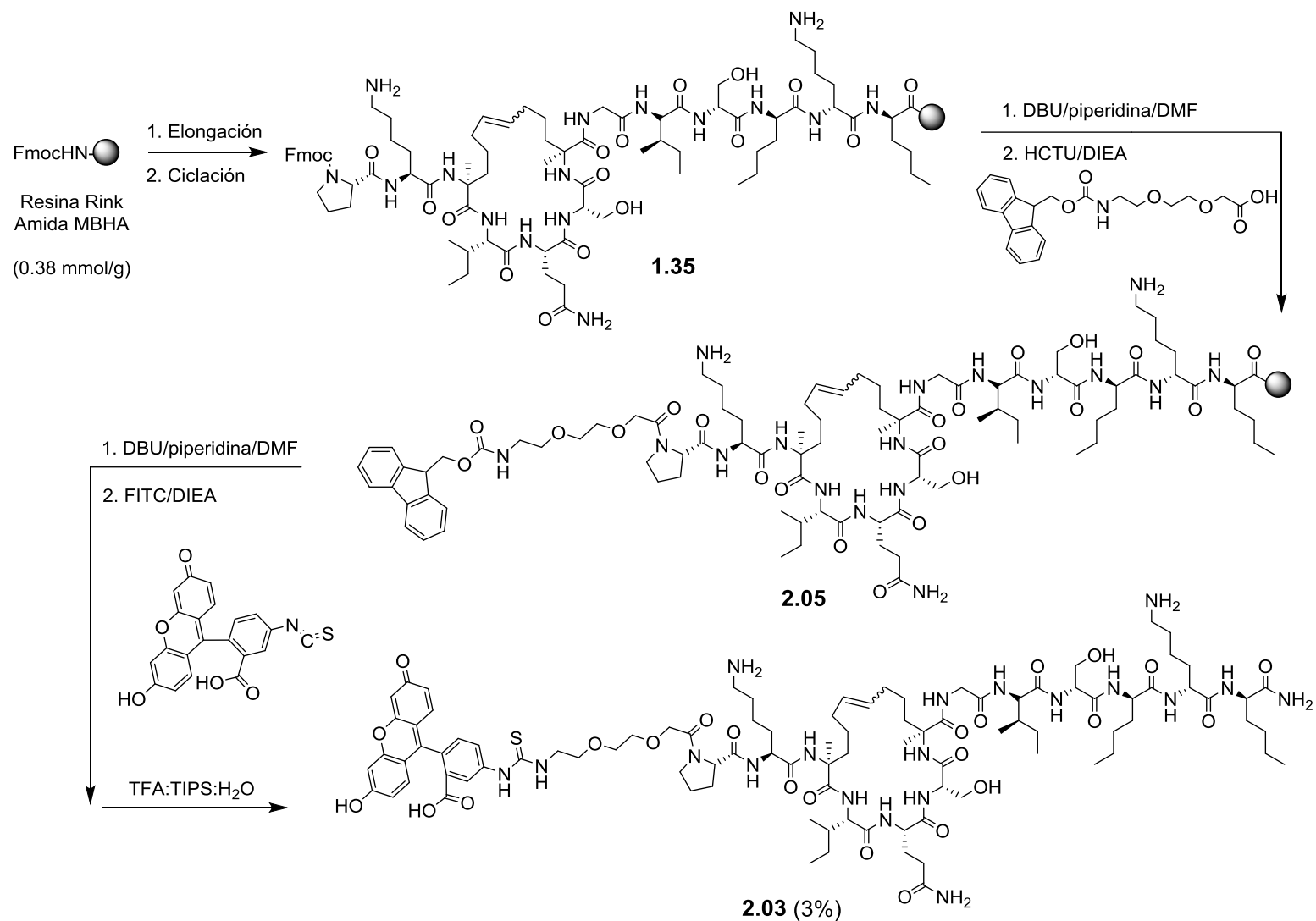
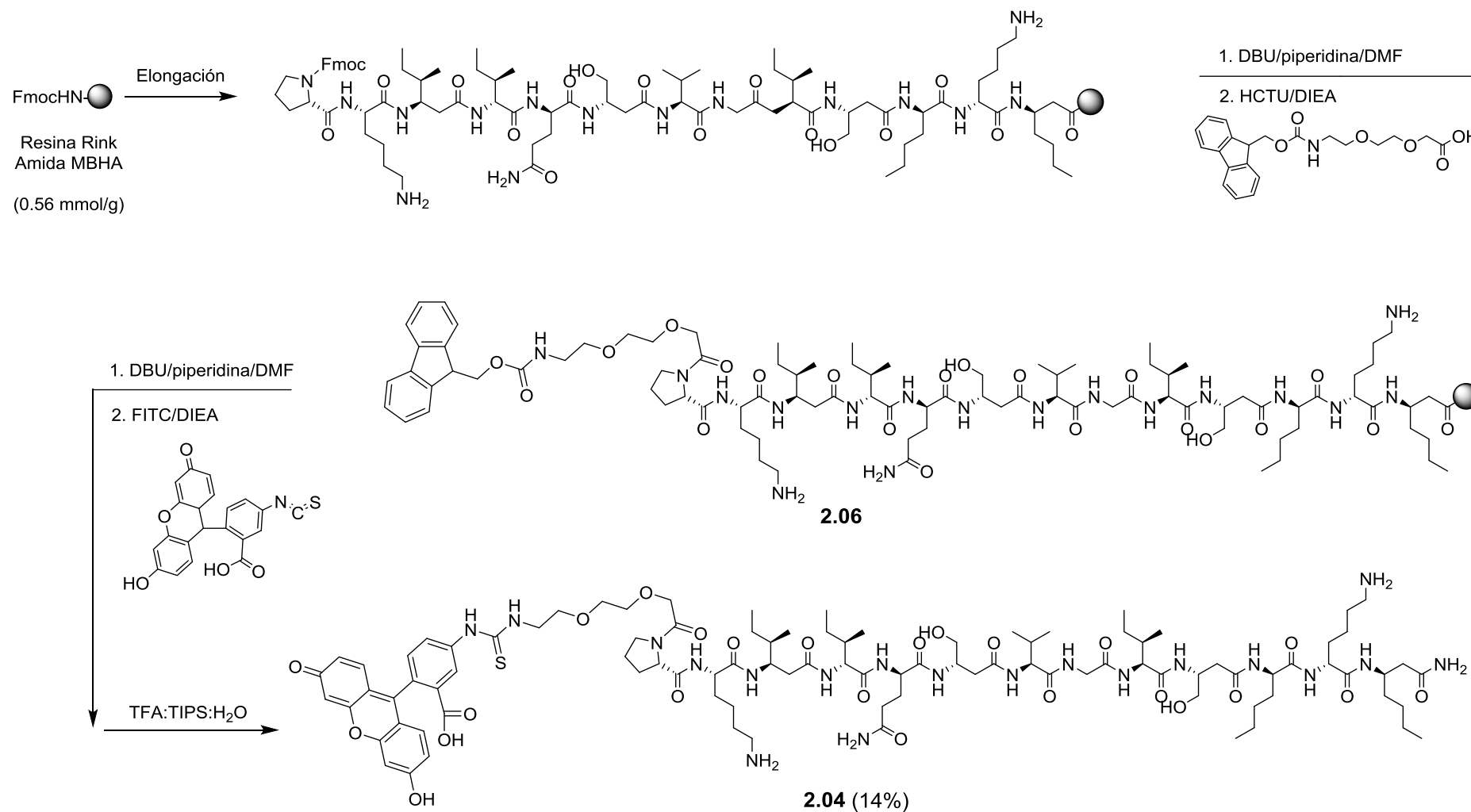


Figura 2.3. Estructura química de los compuestos objetivo marcados con fluoresceína (**2.01-2.04**).

La síntesis de los compuestos fluorescentes **2.01** y **2.02** se encargó a la compañía Peptide Protein Research. La síntesis de los derivados fluorescentes **2.03** y **2.04**, del péptido grapado **1.37b** y del foldámero **1.48** fue realizada en el laboratorio siguiendo una estrategia de síntesis en fase sólida que se detalla en los Esquemas 2.1 y 2.2. Para ello, en primer lugar, se realizó la elongación de las cadenas peptídicas correspondientes siguiendo los procedimientos descritos en el Capítulo 1.



Esquema 2.1. Síntesis del análogo fluorescente del péptido grapado (**1.37b**) marcado con FITC **2.03**.



Esquema 2.2. Síntesis del análogo fluorescente del péptido- α/β (1.48) marcado con FITC 2.04.

Una vez terminada la elongación de las cadenas peptídicas y la etapa de ciclación para el péptido grapado, se desprotegió el grupo Fmoc del extremo *N*-terminal en medio básico y se hizo reaccionar la peptidil-resina correspondiente con ácido {2-[2-(Fmoc-amino)etoxi]etoxi}acético (Fmoc-PEG), en presencia de HCTU como agente de acoplamiento y DIEA como base a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, se llevó a cabo la desprotección del grupo Fmoc en condiciones estándar, seguido de tratamiento con 5-isotiocianato de fluoresceína (FITC) en presencia de DIEA, durante la noche y posterior desanclaje del soporte polimérico en condiciones estándar. Tras la liofilización y purificación de los crudos de reacción, por HPLC semipreparativo, se obtuvieron los compuestos marcados con FITC deseados **2.03** y **2.04** con unos rendimientos globales del 3% y del 14%, respectivamente, y purezas superiores al 95%, determinadas por HPLC.

Una vez obtenidos los péptidos **2.01-2.04** con las sondas fluorescentes en el extremo *N*-terminal se realizaron los experimentos de visualización mediante microscopía confocal para evaluar la capacidad de los compuestos para atravesar tanto la membrana celular de los macrófagos como la de los parásitos de *Leishmania infantum*.

Dichos estudios fueron realizados por D. Miguel A. Toro (del grupo del Dr. Antonio Jiménez) en una estancia predoctoral realizada en el Instituto Paul Ehrlich (Alemania). Las células utilizadas en estos experimentos fueron macrófagos diferenciados a partir de células mononucleares obtenidas de donantes sanos alemanes del *DRK-Blutspendedienst* de Frankfurt. Asimismo, estas células fueron infectadas con amastigotes de *Leishmania major* (MHOM/IL/81/FEBNI). Los amastigotes se encontraban transfectados con un plásmido que les permitía expresar la proteína DsRed la cual puede ser detectada por fluorescencia. La infección fue seguida *in vivo* usando el sistema LSM7 Live y el software de adquisición ZEN black (Carl Zeiss, GER). Con el fin de detectar la fluorescencia de la DsRed (558ex/583em), se utilizó el láser de 561 nm de 40 mW con un filtro de emisión en rojo (>590 nm).

Los experimentos se realizaron en presencia de distintas concentraciones de los compuestos marcados con fluoresceína (5 μ M y 1 μ M), obteniéndose los mejores resultados a una concentración de 5 μ M. Concentraciones más altas de péptido conducían a la formación de precipitados, que fluorescían mucho en el medio de cultivo e impedían una visualización clara de las muestras.

En primer lugar, se analizó si los compuestos eran capaces de atravesar la membrana celular de los macrófagos. Para visualizar las células y los compuestos se utilizó una estrategia que consistía en el tratamiento de los macrófagos con los compuestos durante 16 horas, seguido de lavado de las células para eliminar el compuesto que no hubiese entrado y tinción de las mismas con el colorante *CellMask DeepRed*. Este colorante marca la membrana plasmática de las células haciendo que éstas tengan fluorescencia en rojo. De esta manera, la visualización con microscopía confocal permitiría identificar si los compuestos marcados con fluoresceína (fluorescencia en verde) se encuentran dentro o fuera de las células (fluorescencia en rojo).

A modo de ejemplo, en la Figura 2.4 se recogen las imágenes obtenidas tras el tratamiento de macrófagos, marcadas con *CellMask DeepRed* (rojo), con el péptido **2.01** (verde) a una concentración de 5 μM durante 16 horas.

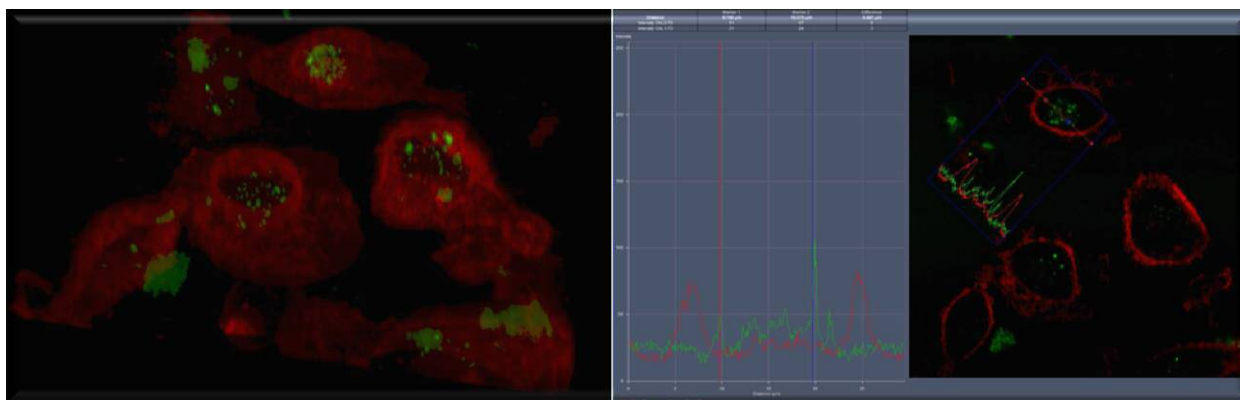


Figura 2.4. Imágenes tomadas por microscopía confocal del tratamiento de macrófagos marcados con *CellMask DeepRed* (rojo) y el péptido **2.01** (verde) a una concentración de 5 μM durante 16h.

Además, se realizó un contraste de fases, una técnica microscópica que se emplea para ver muestras que son transparentes y sin colorear, convirtiendo las partes más densas de la muestra en oscuro y las menos densas en claro. Así, en la Figura 2.5 se observa, en la primera fotografía, un campo en contraste de fases y en la segunda, una superposición de una imagen del mismo campo usando como fluoróforos el péptido conjugado con fluoresceína **2.01** (verde) a una concentración de 5 μM y el *CellMask Deep Red* (rojo), usando en este caso microscopía confocal.

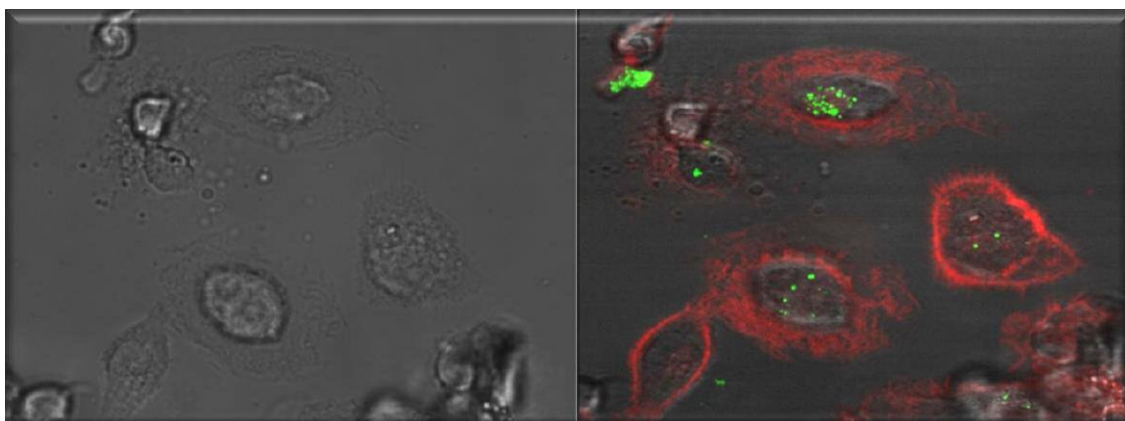


Figura 2.5. Contraste de fases y superposición de esta imagen con macrófagos marcados con *CellMask DeepRed* (rojo) en presencia del péptido fluorescente **2.01** (verde) a una concentración de 5 μ M.

En ambas figuras, no se observa un citoplasma homogéneo teñido de verde que hubiera significado que el péptido (verde) atraviesa la membrana celular del macrófago (rojo), sino que lo que probablemente se observa son vacuolas teñidas de verde. Esto podría explicarse por la formación de agregados de péptido que son fagocitados por el macrófago e incorporados a vacuolas fagocíticas para su degradación.

Por otro lado, en un estudio similar se analizó si los compuestos marcados con fluoresceína atravesarían la membrana de parásitos de *Leishmania*. Para ello, se infectaron macrófagos con parásitos *dsRED* (parásitos que fluorescen en rojo) durante dos horas. A continuación, los parásitos se lavaron y, al igual que se ha mencionado anteriormente, se pusieron en contacto con el péptido durante 16 horas. Con este experimento, se pretendía ver una co-localización de los péptidos y de los parásitos en los macrófagos. En la Figura 2.6 se muestra una de las imágenes de microscopía confocal obtenidas en estos experimentos. Como puede observarse el efecto de co-localización entre el péptido y el parásito no se produce, lo que indica que el péptido no se internaliza, quedando por tanto fuera de los parásitos. Cabe señalar, que dado que se empleó la fluorescencia en rojo para ver los parásitos, no fue posible teñir la membrana celular de los macrófagos con *CellMask DeepRed*.

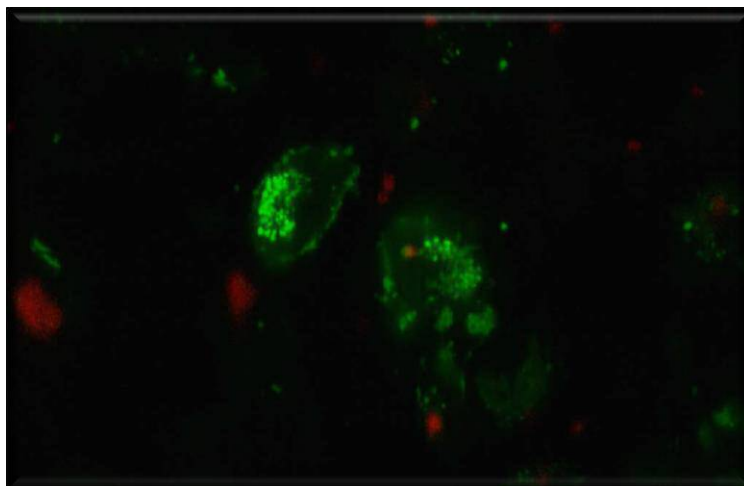


Figura 2.6. Imágenes de microscopía confocal de macrófagos infectados con parásitos dsRED (rojo) en presencia del péptido fluorescente **2.01** (verde) a una concentración de 5 μ M.

Los resultados obtenidos en estos experimentos llevados a cabo con el resto de los compuestos fluorescentes marcados con fluoresceína **2.02-2.04** fueron similares a los observados con **2.01**. Es decir, la visualización mediante microscopía confocal de los compuestos marcados con fluoresceína indicó que los péptidos y peptidomiméticos no eran capaces de atravesar la membrana celular de los parásitos, lo que podría explicar la falta de actividad leishmanicida observada en los ensayos *in vitro* comentados anteriormente.

Seguidamente, con el fin de favorecer el paso de los compuestos a través de las membranas celulares de los parásitos, y estudiar su potencial efecto leishmanicida en cultivo celular, nos planteamos la unión covalente de algunos de los péptidos y peptidomiméticos más representativos a péptidos de penetración celular como transportadores (*cell-penetrating peptides*, CPPs).

2.3. Conjugados de péptidos y peptidomiméticos con péptidos de penetración celular (CPPs)

2.3.1. Síntesis y actividad leishmanicida de los conjugados 2.07-2.15

Los péptidos de penetración celular o péptidos transportadores (CPPs, *cell-penetrating peptides*) son péptidos cortos (generalmente de secuencia no superior a 30 aminoácidos) capaces de atravesar las membranas mediante mecanismos dependientes y/o independientes de energía, sin la necesidad de un reconocimiento

quiral por receptores específicos y sin causar un daño significativo a la membrana.⁴⁻⁷ La mayoría de los péptidos de penetración celular que se conocen en la actualidad son péptidos cargados positivamente, ricos en aminoácidos tales como Arg y Lys, lo que les proporciona un marcado carácter catiónico⁸⁻¹³, aunque también existen algunos CPPs que además contienen residuos hidrófobos, lo que les confiere un carácter anfipático¹⁴⁻¹⁸, que puede facilitar la interacción con la membrana y su posterior internalización. Finalmente, existen un menor número de CPPs hidrófobos¹⁹⁻²² que contienen sólo residuos apolares. En la Figura 2.7 se representan las secuencias de los CPPs más comunes clasificados en función de su naturaleza.

PÉPTIDOS CATIÓNICOS	GRKKRRQRRRPPQ (TAT) RQIKIWFAQNRRRPPQ (Penetratin) RRR _n (Poliargininas) DVVRVWFQNRQKGKR (Oct4) KDCERRFSRSDQLKRHRHTGVKPFQ (WT1-pTj) RKKRRRESRKKRRRES (DPV3)
PÉPTIDOS ANFIPÁTICOS	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (Transportan) KLALKLALKALKAALKLA (MAP) DAATATGRSAASRPTERPRAPARSASRRRPVE (VP22) KETWWETWWTEWSQPKKKRKV (Pep1) KRKRWHW (KW)
PÉPTIDOS HIDROFÓBICOS	AAVLLPVLLAAP (KFGF) PIEVCMYREP (FGF12) VTVLALGALAGVGVG (Péptido Integrin β^3) PFVYLI (C105Y) PLIYLRLRGQF (TP2)

Figura 2.7. Clasificación de los CPPs más comunes en función de su naturaleza química.⁷

El mecanismo de penetración celular que emplean los CPPs es un tema todavía en debate. Se han planteado diversos mecanismos incluyendo la translocación directa a través de la membrana plasmática y la endocitosis.²³⁻²⁸ Los CPPs pueden facilitar la internalización celular de moléculas terapéuticas de naturaleza muy diversa que incluyen moléculas pequeñas²⁹⁻³⁰, péptidos³¹⁻³⁹ y oligonucleótidos⁴⁰⁻⁴¹, nanopartículas⁴², fragmentos grandes de ADN y proteínas⁴³⁻⁴⁵, e incluso agentes de contraste⁴⁶ entre otros. Debido a esta capacidad de penetración poseen un gran

potencial como vectores de administración para su uso en investigación y en medicina.⁴⁷⁻⁵⁰

Frankel y Green^{51,52} demostraron en 1988 que la proteína Tat del VIH era capaz de entrar eficientemente en células tisulares y promover la expresión genética del virus. Posteriormente, el fragmento (48-60) del dominio básico de la proteína (péptido Tat) se describió como uno de los primeros CPPs.⁵³ Este péptido es uno de los CPPs más estudiados y caracterizados hasta el momento.

Además de CPPs de origen natural como Tat, se han descrito CPPs de origen sintético. Dentro de este grupo, las cadenas de poliargininas han sido uno de los CPPs más utilizados⁵⁴. Se han estudiado diferentes longitudes (6-12 residuos) siendo la secuencia de 9 residuos (R₉) una de las más efectivas en el transporte celular⁵⁵.

La membrana de los parásitos de *Leishmania* presenta unas características especiales en comparación con las células de mamíferos, como son su diferente composición lipídica y de proteoglicanos entre otros.⁵⁶ En el año 2012 el grupo del Prof. Luis Rivas del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) en colaboración con el Prof. David Andreu de la Universitat Pompeu Fabra, publicó un estudio en el que demostraba que **Tat** favorecía la entrada de miltefosina en los parásitos de *Leishmania*⁵⁷, mostrando una baja toxicidad. Posteriormente, estos mismos autores realizaron un estudio comparativo en el que analizaron la penetración celular de distintos CPPs en parásitos de *leishmania*, mostrando que la poliarginina R₉ y Tat eran las secuencias de mayor permeabilidad celular con una menor toxicidad en el caso de esta última.⁵⁸

Basándonos en estos antecedentes, como péptidos de penetración celular para el diseño de conjugados con los péptidos y peptidomiméticos anteriormente mencionados (**1.01**, **1.09** y **1.48**) en este capítulo seleccionamos las **poliargininas**, en concreto elegimos la secuencia de nueve residuos (R₉) que es la longitud que ha demostrado la mayor eficacia de penetración, y la secuencia **TAT** (GRKKRRQRRRPPQ). Asimismo, utilizamos una secuencia de poliargininas modificada (RRAib)₃, con la que recientemente se ha descrito una buena capacidad de permeabilidad celular y menor toxicidad que la secuencia R₉ estándar.⁵⁹

La unión covalente del péptido de penetración celular R₉ al péptido lineal **1.01** se llevó a cabo tanto a través del extremo *N*-terminal como del *C*-terminal del péptido mientras que en el resto de los conjugados se unió al extremo *N*-terminal.

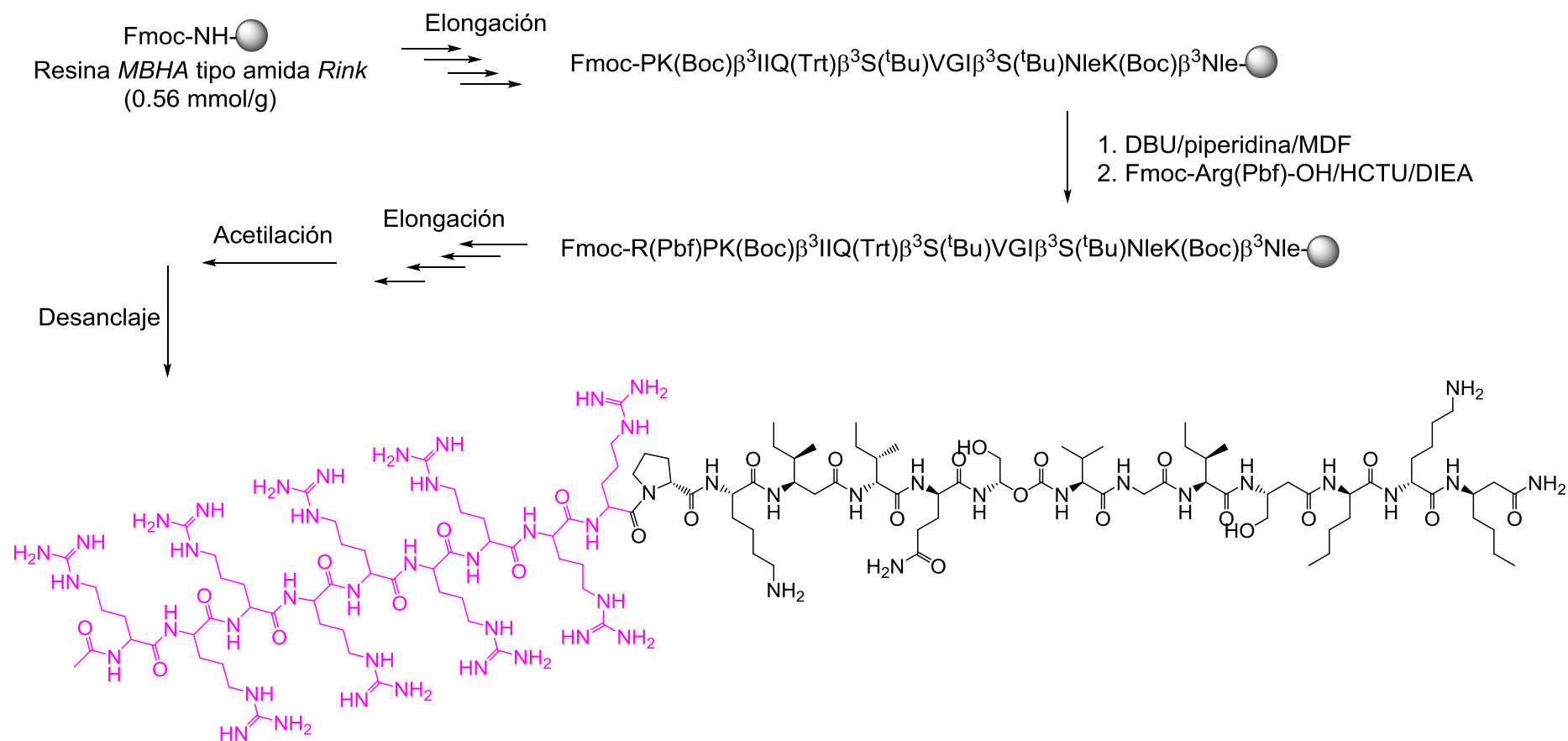
En la Figura 2.8 se recogen las estructuras de los conjugados de los péptidos y peptidomiméticos con CPPs (**2.07-2.11** y **2.14**) objetivo en este trabajo. También se obtuvieron como control las secuencias R₉ (**2.12**) y TAT (**2.15**), así como el conjugado **2.13** de un péptido *scrambled* con R₉, que nos permitiría estudiar si los resultados obtenidos son específicos de la secuencia peptídica.

Estructura de los conjugados de péptidos y peptidomiméticos con CPPs objetivo		
POLIARGININAS	Ac- RRRRRRRRRR PKIIQSVGISNleKNle-NH ₂	2.07
	Ac-PKIIQSVGISNleKNle RRRRRRRRRR -NH ₂	2.08
	Ac- RRRRRRRRRR PK(EIQSK)GISNleKNle-NH ₂	2.09
	Ac- RRRRRRRRRR PKβ ³ IIQβ ³ SVGIβ ³ SNleKβ ³ Nle-NH ₂	2.10
	Ac-(RR-Aib) ₃ -PK(EIQSK)GISNleKNle-NH ₂	2.11
	Ac- RRRRRRRRRR -NH ₂ (R ₉)	2.12
	Ac- RRRRRRRRRR KMGISSMVQPKII-NH ₂ (<i>Scrambled</i>)	2.13
TAT	Ac- GRKKRRQRRRPPQ PKIIQSVGISNleKNle-NH ₂	2.14
	Ac- GRKKRRQRRRPPQ -NH ₂ (TAT)	2.15

Figura 2.8. Estructuras de los conjugados de péptidos y peptidomiméticos con CPPs (rosa) objetivo.

Dado que en nuestro grupo no disponíamos de un sintetizador de péptidos que nos facilitara la síntesis de los conjugados diseñados, decidimos encargar algunas de estas estructuras a la empresa francesa Genosphere Biotechnologies. El conjugado **2.10** del foldámero **1.48** con poliargininas en el extremo *N*-terminal (Ac-RRRRRRRRRRPKβ³IIQβ³SVGIβ³SNleKβ³Nle-NH₂) fue sintetizado en nuestros laboratorios tal y como se describe en el Esquema 1.3.

La síntesis de **2.10** se llevó a cabo en fase sólida de manera manual empleando una resina *MBHA* de tipo amida *Rink* de carga 0.56 mmol/g siguiendo los protocolos generales descritos en el Capítulo 1. Todos los acoplamientos se realizaron en microondas a 40 °C empleando HCTU como agente de acoplamiento y DIEA como base. Una vez completada la elongación del péptido y realizada la protección del extremo *N*-terminal en forma de *N*-acetilo, se procedió a la escisión del producto final de la resina. Tras precipitación, liofilización y purificación del crudo de reacción se obtuvo el péptido **2.10** con un rendimiento global del 7% y una pureza superior al 91% por HPLC.



2.10

Esquema 1.3. Síntesis del conjugao **2.10** del péptido de penetración celular de poliargininas (en rosa) con un péptido- α/β .

A continuación, se realizaron los ensayos de actividad leishmanicida y de citotoxicidad de los conjugados [péptidos/peptidomiméticos]-[CPPs] **2.07-2.15** en cultivos celulares de promastigotes y amastigotes de *L. infantum* y en la línea celular humana THP-1. En una primera fase los compuestos se evalúan a una concentración de 25 μM . Si se observa que mueren más del 50% de las células, se llevan a cabo los ensayos a diferentes concentraciones de los compuestos usando como concentración máxima 25 μM y se determina la CE_{50} . En estos ensayos se incluyeron como fármacos de referencia Edelfosina⁶⁰ y Miltefosina⁶¹⁻⁶³, utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis. En la Tabla 2.2 se recogen los valores de CE_{50} obtenidos en estos ensayos a 24 horas.

Tabla 2.2. Valores de $\text{CE}_{50} \pm \text{DE}$ (desviación estándar) (μM) de los conjugados con péptidos transportadores **2.07-2.15** frente a promastigotes y amastigotes de *Leishmania infantum* y valores de citotoxicidad frente a células THP-1 a 24 horas.

Compuestos		CE_{50}^* Promastigotes (μM)	CE_{50}^* Amastigotes (μM)	CE_{50}^* THP-1 (μM)
POLIARGININAS	2.07 Ac- RRRRRRRRRR PKIIQSVGISNleKNle-NH ₂	3.34 \pm 0.11	5.23 \pm 0.33	2.36 \pm 0.18
	2.08 Ac-PKIIQSVGISNleKNle RRRRRRRRRR -NH ₂	4.16 \pm 0.49	1.49 \pm 0.15	0.86 \pm 0.09
	2.09 Ac- RRRRRRRRRR PK(EIQSK)GISNleKNle-NH ₂	3.40 \pm 0.13	3.25 \pm 0.11	2.87 \pm 0.29
	2.10 Ac- RRRRRRRRRR PK β^3 IIQ β^3 SVGI β^3 SNleK β^3 Nle-NH ₂	0.97 \pm 0.01	0.78 \pm 0.08	7.07 \pm 0.75
	2.11 Ac-(RR-Aib) ₃ -PK(EIQSK)GISNleKNle-NH ₂	6.52 \pm 0.41	11.53 \pm 0.66	4.82 \pm 0.18
	2.12 Ac- RRRRRRRRRR -NH ₂	19.42 \pm 0.79	≥ 25	≥ 25
	2.13 Ac- RRRRRRRRRR KMGISSMVQPKII-NH ₂	> 25	≥ 25	≥ 25
TAT	2.14 Ac- GRKKRRQRRRPQ PKIIQSVGISNleKNle-NH ₂	2.07 \pm 0.34	1.10 \pm 0.05	1.14 \pm 0.25
	2.15 Ac- GRKKRRQRRRPQ -NH ₂	> 25	> 25	> 25
MILTEFOSINA		15.0 \pm 10.8	2.8 \pm 0.1	18.5 \pm 0.6
EDELFOFINA		3.6 \pm 0.2	0.8 \pm 0.1	5.0 \pm 0.2

* CE_{50} es la concentración de compuesto que causa una disminución del 50% de la concentración de los parásitos o de las células humanas

Como puede observarse, según los valores de CE_{50} , todos los conjugados con péptidos de penetración celular (**2.07-2.11** y **2.14**) presentan una actividad leishmanicida potente tanto frente a promastigotes como a amastigotes, en el rango micromolar bajo, siendo el conjugado **2.10** del foldámero **1.48** el más activo de la serie.

Estos valores son similares a los de los fármacos de referencia Edelfosina y Miltefosina. Cabe destacar que las secuencias de los péptidos transportadores R₉ y Tat por sí solas (**2.12** y **2.15**) no presentan actividad leishmanicida, lo que indica que la contribución del péptido lineal, del péptido cíclico o del péptido- α/β en los correspondientes conjugados es muy importante para la actividad. Asimismo, esta actividad es dependiente de la secuencia, ya que el conjugado del péptido *scrambled* **2.13**, con R₉, resultó inactivo. En cuanto a la serie de conjugados con R₉ como péptido de penetración celular, no se observan diferencias significativas en la actividad entre la unión de éste en el extremo *N*-terminal o *C*-terminal (**2.07** vs **2.08**) al péptido lineal **1.01**. Asimismo, tampoco se observan grandes diferencias de actividad leishmanicida entre los conjugados de poliarginina en el extremo *N*-terminal (**2.07** y **2.09**) con el péptido lineal de referencia (**1.01**) y el péptido cíclico con puente amida (**1.09**). Sin embargo, el conjugado **2.10** del foldámero (**1.48**) resultó de 3 a 5 veces más activo. Si analizamos la naturaleza del CPP, la sustitución del péptido de penetración celular R₉ por la secuencia (RR-Aib)₃ en los conjugados del péptido cíclico con puente amida (**2.09** y **2.11**), da lugar a una reducción de 2 a 4 veces de la actividad leishmanicida (**2.09** vs **2.11**) mientras que el conjugado del péptido lineal con Tat presenta valores de actividad ligeramente superiores al conjugado con R₉ (**2.14** vs **2.07**).

Todos los conjugados resultaron citotóxicos frente a células humanas THP-1. Sin embargo, cabe destacar que el conjugado del foldámero con poliargininas **2.10** resultó ser el menos citotóxico observándose índices de selectividad (ratio de los valores de CE₅₀ de los compuestos en THP-1 con los valores frente a promastigotes y amastigotes) con valores de 7 y 9, que eran similares o incluso superiores a los de los fármacos de referencia edelfosina y miltefosina.

2.3.2. Estudios de internalización del conjugado [fluoresceína]-[1.01]-[RRRRRRRRR] (2.16)

Finalmente, nos planteamos el marcaje con sondas fluorescentes para visualizar mediante microscopía confocal si el conjugado del péptido lineal **1.01** con un péptido de penetración celular atraviesa la membrana celular de los parásitos (y células humanas). Para ello diseñamos el conjugado **2.16** cuya estructura se recoge en la Figura 2.9. En el conjugado propuesto la sonda fluorescente de fluoresceína se uniría al extremo *N*-terminal del péptido lineal **1.01**, a través de un espaciador polimetilénico de 6 eslabones, mientras que el péptido de penetración celular R₉ se introduciría en el

extremo *C*-terminal, ya que en los estudios previos de actividad leishmanicida no se habían observado diferencias significativas en la introducción de la secuencia de poliargininas en el extremo *N*-terminal o *C*-terminal del péptido. De esta manera, la sonda fluorescente y el péptido de penetración celular estarían separados espacialmente en el conjugado propuesto. La síntesis de este compuesto se encargó a la empresa Genosphere Biotechnologies.

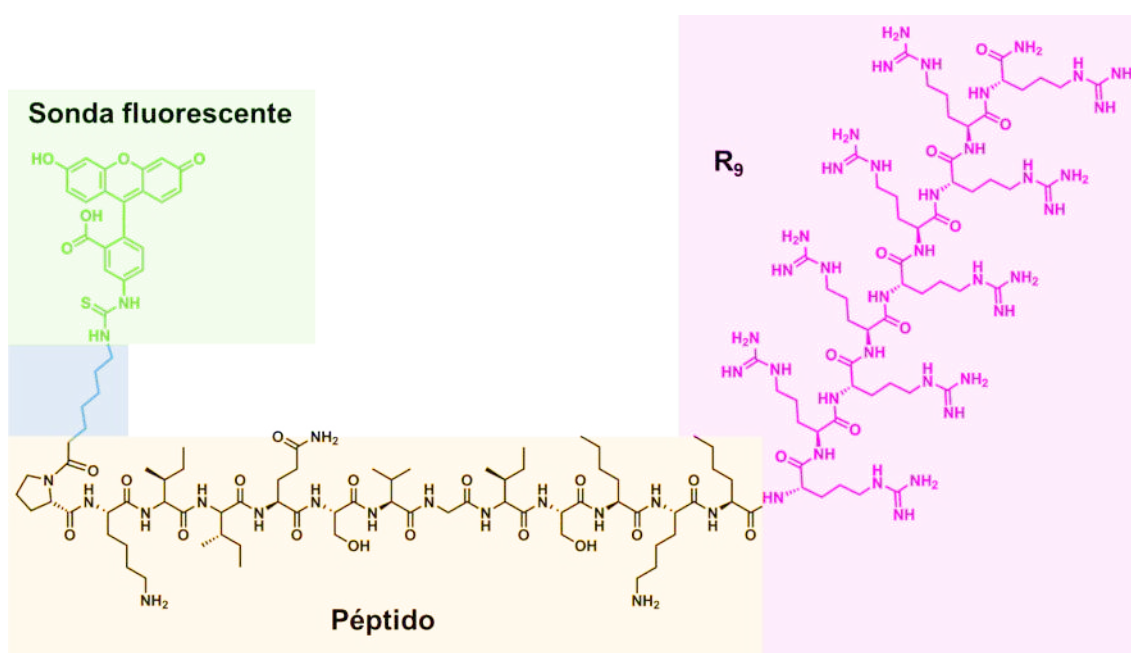


Figura 2.9. Estructura del conjugado [fluoresceína]-[1.01]-[RRRRRRRRRR] (**2.16**) propuesto, donde la sonda fluorescente de fluoresceína se representa en verde, el espaciador C6 en azul y el péptido de penetración celular en rosa.

Los estudios de internalización se realizaron en la Universidad de Alcalá por el equipo del Dr. Antonio Jiménez mediante microscopía confocal utilizando un sistema Leica TCS SL (Leica Microsystem GmbH) dotado de dos láseres de excitación (Arg 488 nm y He-Ne 543 nm).

En las Figuras 2.10, 2.11 y 2.12 se muestran las imágenes de microscopía confocal obtenidas en los estudios de incubación del conjugado **2.16** con promastigotes, amastigotes axénicos y células THP-1 (monocitos), respectivamente, a una concentración de 25 μ M durante 2 horas. En estos estudios para la tinción de los núcleos de los kinetoplastos se usa DAPI, que se une inespecíficamente a los ácidos nucleicos tiñéndolos de azul.

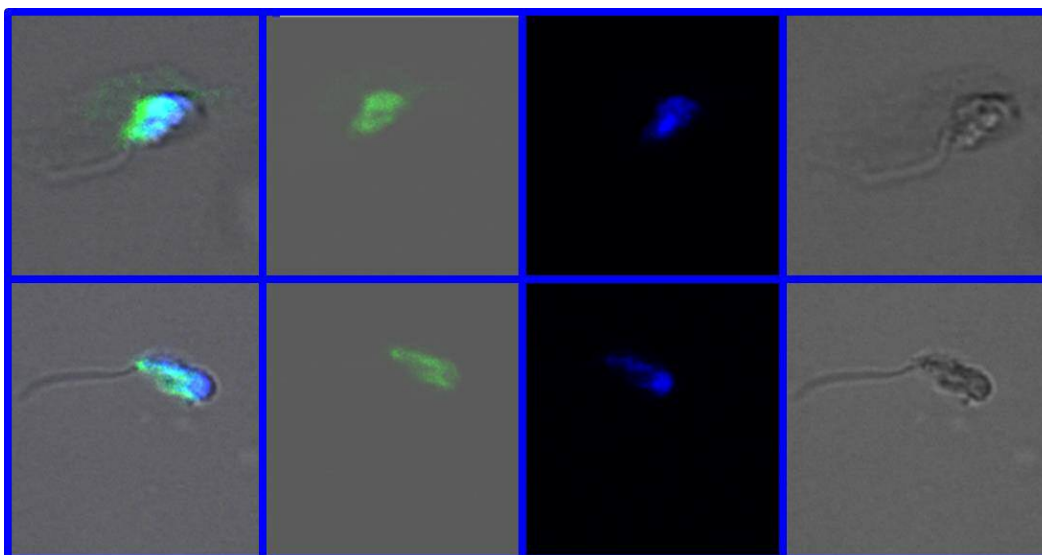


Figura 2.10. Imágenes tomadas por microscopía confocal en la incubación del conjugado **2.16** en células infectadas con promastigotes a una concentración de 25 μM durante 2 horas.

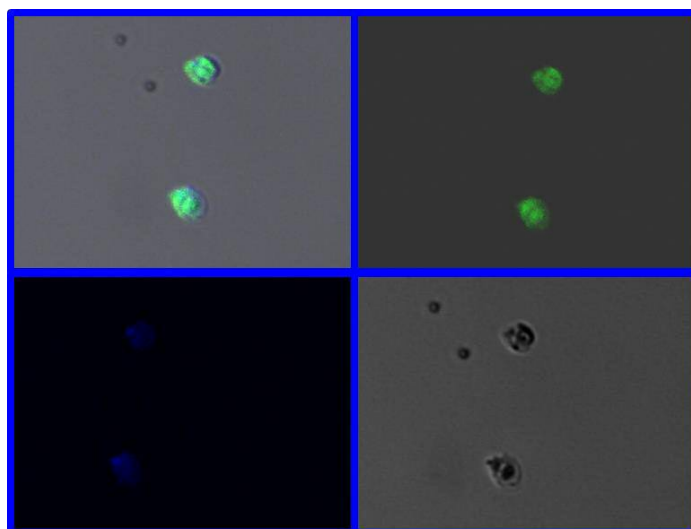


Figura 2.11. Imágenes tomadas por microscopía confocal en la incubación del conjugado **2.16** con amastigotes axénicos a una concentración de 25 μM durante 2 horas.

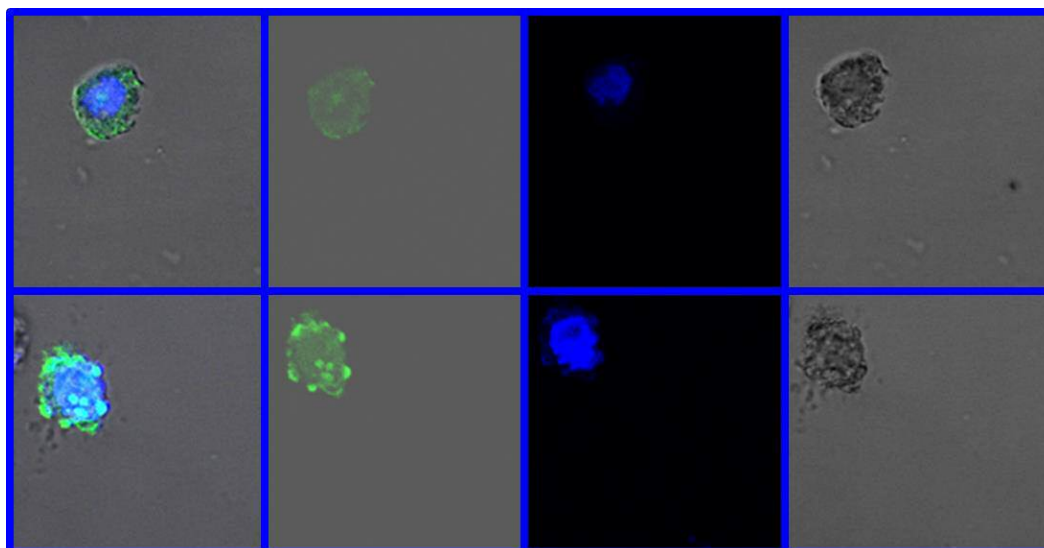


Figura 2.12. Imágenes tomadas por microscopía confocal en la incubación del conjugado **2.16** con células THP-1 (monocitos) a una concentración de 25 μ M durante 2 horas.

En las imágenes de las tres figuras se pudo observar una co-localización de la fluorescencia verde (conjugado) en el interior de los parásitos y de los monocitos (en azul), lo que sugería que el conjugado **2.16** había sido internalizado pero no se podía ver una localización específica. Además, cabe destacar que en estas imágenes no se observa la forma típica o capacidad de refractar la luz de los parásitos y monocitos cuando están vivos lo que indica que el conjugado **2.16** ha producido la muerte de la mayoría de los parásitos y de las células humanas. El cambio de forma se observa especialmente en los promastigotes, que suelen tener una forma alargada cuando están vivos (como la de la Figura 2.10) pero al morir tienden a redondearse y a ganar volumen.

Recientemente, se han realizado estudios de microscopía de fluorescencia donde el conjugado **2.16** se incubó en presencia de promastigotes durante tiempos más cortos (15-30 minutos) para evitar la muerte de los parásitos y poder visualizar con más detalle el lugar de entrada de los compuestos al parásito. En la Figura 2.13 se recogen imágenes de estos estudios donde es interesante destacar que se observa una tinción en la base del flagelo que coincide con la posición del bolsillo flagelar, que es el único punto de intercambio del parásito con el exterior.

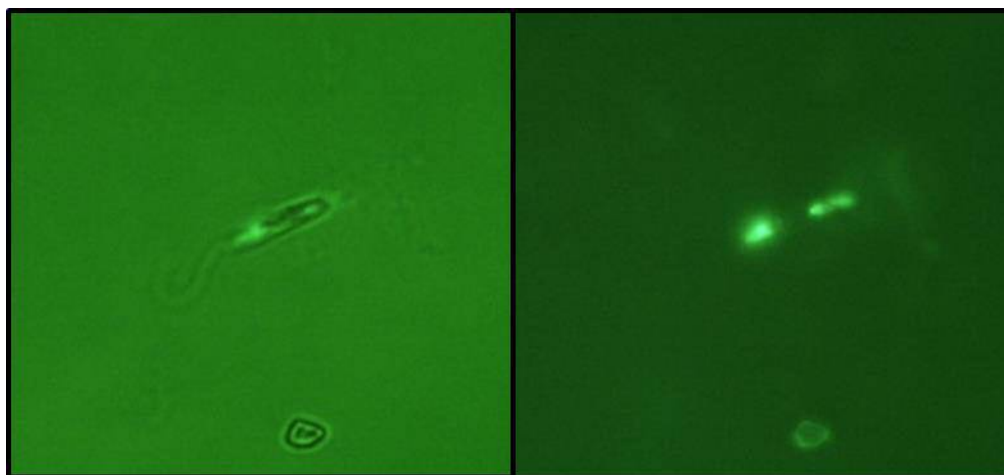


Figura 2.13. Imágenes tomados por microscopía de fluorescencia del conjugado **2.16** en cultivo de promastigotes durante 15-30 minutos.

Todos estos resultados demuestran que la unión covalente del péptido de penetración celular de poliargininas (R_9) permite la internalización efectiva del péptido o peptidomimético al interior de los parásitos de *Leishmania infantum* y de los monocitos humanos, lo que explicaría los resultados de actividad leishmanicida y de citotoxicidad obtenidos en los ensayos *in vitro* mencionados anteriormente.

2.4. Conclusiones

En este capítulo se ha llevado a cabo la evaluación *in vitro* de la actividad leishmanicida y citotóxica de los péptidos y peptidomiméticos más representativos de cada una de las series descritas en el Capítulo 1, observándose que estos eran inocuos tanto frente a los parásitos en su forma promastigote y amastigote, como frente a monocitos humanos THP-1. Los estudios de microscopía confocal realizados con análogos fluorescentes de dichos péptidos y peptidomiméticos (**2.01-2.04**), demostraron que estos compuestos no atraviesan las membranas celulares de los parásitos, lo que explicaría la falta de actividad leishmanicida observada en los ensayos *in vitro*.

➤ La conjugación de los mismos con los péptidos de penetración celular (CPPs) tales como poliargininas R_9 y la secuencia TAT (**2.07-2.11** y **2.14**) ha conducido a una mejora de la penetración celular. Los conjugados han mostrado una actividad leishmanicida potente tanto frente a promastigotes como a amastigotes (en el rango micromolar bajo), con valores similares a los de los fármacos de referencia Edelfosina

y Miltefosina. El conjugado del foldámero con poliargininas **2.10** es el compuesto más activo de la serie alcanzándose valores en el rango submicromolar.

➤ Las secuencias de los péptidos de penetración celular R₉ y Tat por sí solas (**2.12** y **2.15**) no presentan actividad leishmanicida, lo que indica que son el péptido lineal, péptido cíclico o péptido- α/β los responsables de la actividad. La inactividad del conjugado del péptido *scrambled* **2.13** demuestra que la actividad es específica de la secuencia del péptido.

➤ Todos los conjugados de los péptidos lineales y cíclicos, tanto con poliargininas como con Tat, resultaron citotóxicos frente a células THP-1. Sin embargo, el conjugado del foldámero con poliargininas **2.10** resultó menos citotóxico, alcanzándose así unos índices de selectividad similares o incluso superiores a los fármacos de referencia edelfosina y miltefosina.

➤ Estudios de microscopía confocal y de fluorescencia con el conjugado [fluoresceína]-[**1.01**]-[RRRRRRRRRR] **2.16** han permitido visualizar que el uso de péptidos de penetración celular es una estrategia efectiva para la internalización de péptidos y peptidomiméticos al interior celular de parásitos de *Leishmania infantum* y de monocitos humanos.

2.5. Bibliografía

1. Desjeux, P. Leishmaniasis. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 692-693
2. Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2004**, *27*, 305-318.
3. Chanput, W.; Mes, J. J.; Wichers, H. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology.* **2014**, *23*, 37-45.
4. Ramsey, J D.; Flynn, N. H. Cell-penetrating peptides transport therapeutics into cells. *Pharmacology Therapeutic.* **2015**, *154*, 78-86.
5. Copolovici, D. A.; Langel, K.; Eriste, E.; Langel, Ü. Cell-penetrating peptides: design, synthesis, and applications. *ACS Nano.* **2014**, *8*, 1972-1994.
6. Koren, E.; Torchilin, V. P. Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side. *Trends Mol. Med.* **2012**, *18*, 385-393.
7. Wang, F.; Wang, Y.; Zhang, X.; Zhang, W.; Guo, S.; Jin, F. Recent progress of cell-penetrating peptides as new carriers for intracellular cargo delivery. *J. Control Release.* **2014**, *174*, 126-136.
8. Frankel, A. D.; Pabo, C. O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell.* **1988**, *55*, 1189-1193.
9. Joliot, A.; Pernelle, C.; Deagostini-Bazin, H.; Prochiantz, A. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1991**, *88*, 1864-1868.
10. Wender, P. A; Mitchell, D. J.; Pattabiraman, K.; Pelkey, E. T.; Steinman, L.; Rothbard, J. B. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 13003-13008.
11. Harreither, E.; Rydberg, H. A.; Amand, H. L.; Jadhav, V.; Fliedl, L.; Benda, C.; Esteban, M. A.; Pei, D.; Borth, N.; Grillari-Voglauer, R.; Hommerding, O.; Edenhofer, F.; Nordén, B.; Grillari, J. Characterization of a novel cell penetrating peptide derived from human Oct4. *Cell Regeneration.* **2014**, *3*, 2.
12. Massaoka, M. H.; Matsuo, A. L.; Figueiredo, C. R.; Girola, N.; Faria, C. F.; Azevedo, R. A.; Travassos, L. R. A novel cell-penetrating peptide derived from WT1 enhances p53 activity,

induces cell senescence and displays antimelanoma activity in xeno- and syngeneic systems. *FEBS Open Bio.* **2014**, *4*, 153-161.

13. De Coupade, C.; Fittipaldi, A.; Chagnas, V.; Michel, M.; Carlier, S.; Tasciotti, E.; Darmon, A.; Ravel, D.; Kearsey, J.; Giacca, M.; Cailler, F. Novel human-derived cell-penetrating peptides for specific subcellular delivery of therapeutic biomolecules. *Biochem. J.* **2005**, *390*, 407-418.

14. Pooga, M.; Hällbrink, M.; Zorko, M.; Langel, U. Cell penetration by transportan. *FASEB J.* **1998**, *12*, 67-77.

15. Oehlke, J.; Scheller, A.; Wiesner, B.; Krause, E.; Beyermann, M.; Klauschenz, E.; Melzig, M.; Bienert, M. Cellular uptake of an α -helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1998**, *1414*, 127-139.

16. Elliott, G.; O'Hare, P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell.* **1997**, *88*, 223-233.

17. Morris, M. C.; Depollier, J.; Mery, J.; Heitz, F.; Divita, G. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 1173-1176.

18. Wei, Y.; Li, C.; Zhang, L.; Xu, X. Design of novel cell penetrating peptides for the delivery of trehalose into mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **2014**, *1838*, 1911-1920.

19. Lin, Y. Z.; Yao, S.; Veach, R. A.; Torgerson, T. R.; Hawiger, J. Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-KB by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 14255-14258.

20. Liu, K.; Timmons, S.; Lin, Y. Z.; Hawiger, J. Identification of a functionally important sequence in the cytoplasmic tail of integrin beta 3 by using cell-permeable peptide analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 11819-11824.

21. Rhee, M.; Davis, P. Mechanism of uptake of C105Y, a novel cell-penetrating peptide. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 1233-1240.

22. Marks, J. R.; Placone, J.; Hristova, K.; Wimley, W. C. Spontaneous membrane-translocating peptides by orthogonal high-throughput screening. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8995-9004.

23. Madani, F.; Lindberg, S.; Langel, U.; Futaki, S.; Graslund, A. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J. Biophys.* **2011**, *2011*, 414729.

24. Milletti, F. Cell-penetrating peptides: Classes, origin, and current landscape. *Drug Discov. Today*. **2012**, *17*, 850-860.
25. Richard, J. P.; Melikov, K.; Vives, E.; Ramos, C.; Verbeure, B.; Gait, M. J.; Chernomordik, L. V.; Lebleu, B. Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 585–590.
26. Richard, J. P.; Melikov, K.; Brooks, H.; Prevot, P.; Lebleu, B.; Chernomordik, L. V. Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 15300-15306.
27. Duchardt, F.; Fotin-Mleczek, M.; Schwarz, H.; Fischer, R.; Brock, R. A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic* **2007**, *8*, 848–866.
28. Lundin, P.; Johansson, H.; Guterstam, P.; Holm, T.; Hansen, M.; Langel, U.; EL Andaloussi, S. Distinct uptake routes of cell-penetrating peptide conjugates. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2535-2542.
29. Nakase, I.; Konishi, Y.; Ueda, M.; Saji, H.; Futaki, S. Accumulation of arginine-rich cell-penetrating peptides in tumors and the potential for anticancer drug delivery in vivo. *J. Control Release*. **2012**, *159*, 181-188.
30. Cai, D.; Gao, W.; He, B.; Dai, W.; Zhang, H.; Wang, X.; Wang, J.; Zhang, X.; Zhang, Q. Hydrophobic penetrating peptide PFVYLI-modified stealth liposomes for doxorubicin delivery in breast cancer therapy. *Biomaterials*. **2014**, *35*, 2283-2294.
31. Perea, S. E.; Reyes, O.; Puchades, Y.; Mendoza, O.; Vispo, N. S.; Torrens, I.; Santos, A.; Silva, R.; Acevedo, B.; López, E.; Falcón, V.; Alonso, D. F. Antitumor effect of a novel proapoptotic peptide that impairs the phosphorylation by the protein kinase 2 (casein kinase 2). *Cancer Res.* **2004**, *64*, 7127-7129.
32. Plescia, J.; Salz, W.; Xia, F.; Pennati, M.; Zaffaroni, N.; Daidone, M. G.; Meli, M.I.; Dohi, T.; Fortugno, P.; Nefedova, Y.; et al. Rational design of shepherdin, a novel anticancer agent. *Cancer Cell*. **2005**, *7*, 457-468.
33. Fotin-Mleczek, M.; Welte, S.; Mader, O.; Duchardt, F.; Fischer, R.; Hufnagel, H.; Scheurich, P.; Brock, R. Cationic cell-penetrating peptides interfere with TNF signalling by induction of TNF receptor internalization. *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 3339-3351.

34. Li, Y.; Mao, Y.; Rosal, R. V.; Dinnen, R. D.; Williams, A. C.; Brandt-Rauf, P. W.; Fine R. L. Selective induction of apoptosis through the FADD/caspase-8 pathway by a p53 c-terminal peptide in human pre-malignant and malignant cells. *Int. J. Cancer*. **2005**, *115*, 55-64.
35. Senatus, P. B.; Li, Y.; Mandigo, C.; Nichols, G.; Moise, G.; Mao, Y.; Brown, M. D.; Anderson, R. C.; Parsa, A. T.; Brandt-Rauf, P. W.; Bruce, J. N.; Fine, R. L. Restoration of p53 function for selective Fas-mediated apoptosis in human and rat glioma cells in vitro and in vivo by a p53 COOH-terminal peptide. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 20-28.
36. Jiang, T.; Olson, E. S.; Nguyen, Q. T.; Roy, M.; Jennings, P. A.; Tsien, R. Y. Tumor imaging by means of proteolytic activation of cell-penetrating peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2004**, *101*, 17867-17872.
37. D'Ursi, A. M.; Giusti, L.; Albrizio, S.; Porchia, F.; Esposito, C.; Caliendo, G.; Gargini, C.; Novellino, E.; Lucacchini, A.; Rovero, P.; Mazzoni, R. A Membrane-permeable peptide containing the last 21 residues of the G{alpha}S carboxyl terminus inhibits GS-coupled receptor signaling in intact cells: correlations between Peptide structure and biological activity. *Mol. Pharmacol.* **2006**, *69*, 727-736.
38. Hällbrink, M.; Kilk, K.; Elmquist, A.; Lundberg, P.; Lindgren, M.; Jiang, Y.; Pooga, M.; Soomets, U.; Langel, U. Prediction of cell-penetrating peptides. *Int. J. Pep. Res. Ther.* **2005**, *11*, 1-11.
39. Östlund, P.; Kilk, K.; Lindgren, M.; Hällbrink, M.; Jiang, Y.; Budihna, M.; Cerne, K.; Bavec, A.; Östenson, C. G.; Zorko, M.; Langel, Ü. Cell-penetrating mimics of agonist-activated G-protein coupled receptors. *Int. J. Pep. Res. Ther.* **2005**, *2005*, 237-247.
40. Turner, J. J.; Arzumanov, A. A.; Gait, M. J. Synthesis, cellular uptake and HIV-1 Tat-dependent trans-activation inhibition activity of oligonucleotide analogues disulphide-conjugated to cell-penetrating peptides. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 27-42.
41. Turner, J. J.; Ivanova, G. D.; Verbeure, B.; Williams, D.; Arzumanov, A. A.; Abes, S.; Lebleu, B.; Gait, M. J. Cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids (PNA) as inhibitors of HIV-1 Tat-dependent trans-activation in cells. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 6837-6849.
42. Liu, S. Y.; Wei, W.; Yue, H.; Ni, Z. G.; Wang, S.; Fu, Q.; Wang, Y. Q.; Ma, G. H.; Su, Z. G. Nanoparticles-based multi-adjuvant whole cell tumor vaccine for anticancer immunotherapy. *Biomaterials*. **2013**, *34*, 8291-8300.

43. Cao, L.; Si, J.; Wang, W.; Zhao, X.; Yuan, X.; Zhu, H.; Wu, X.; Zhu, J.; Shen, G. Intracellular localization and sustained prodrug cell killing activity of TAT-HSVTK fusion protein in hepatocellular carcinoma cells. *Mol. Cells*. **2006**, *21*, 104-111.
44. Jo, D.; Liu, D.; Yao, S.; Collins, R. D.; Hawiger, J. Intracellular protein therapy with SOCS3 inhibits inflammation and apoptosis. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 892-898.
45. Bleifuss, E.; Kammertoens, T.; Hutloff, A.; Quarcoo, D.; Dorner, M.; Straub, P.; Uckert, W.; Hildt, E. The translocation motif of hepatitis B virus improves protein vaccination. *Cell Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 627-635.
46. Fonseca, S. B.; Pereira, M. P.; Kelley, S. O. Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 953-964.
47. Skotland, T.; Iversen, T. G.; Sandvig, K. Development of nanoparticles for clinical use. *Nanomedicine* **2014**, *9*, 1295-1299.
48. Pysz, M. A.; Gambhir, S.S.; Willmann, J. K. Molecular imaging: Current status and emerging strategies. *Clin. Radiol.* **2010**, *65*, 500-516.
49. Condeelis, J.; Weissleder, R. *In vivo* imaging in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2*: a003848.
50. Mäe, M.; Langel, U. Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery. *Curr. Opinion Pharm.* **2006**, *6*, 509-514.
51. Frankel, A. D.; Pabo, C. O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*. **1988**, *55*, 1189-1193.
52. Green, M.; Loewenstein, P. M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell*. **1988**, *55*, 1179-1188.
53. Vivès, E.; Granier, C.; Prevot, P.; Lebleu, B. Structure-activity relationship study of the plasma membrane translocating potential of a short peptide from HIV-1 Tat protein. *Lett. Pept. Sci.* **1997**, *4*, 429-436.
54. Zhang, C.; Tang, N.; Liu, X.; Liang, W.; Xu, W.; Torchilin, V. P. siRNA-containing liposomes modified with polyarginine effectively silence the targeted gene. *J. Control. Release*. **2006**, *112*, 229-239.

55. Wender, P. A.; Mitchell, D. J.; Pattabiraman, K.; Pelkey, E. T.; Steinman, L.; Rothbard, J. B. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 13003-13008.
56. McConville Ferguson, M. A. J. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem. J.* **1993**, *294*, 305-324.
57. Luque-Ortega, J. R.; de la Torre, B. G.; Hornillos, V.; Bart, J. M.; Rueda, C.; Navarro, M.; Amat-Guerri, F.; Acuña, A. U.; Andreu, D.; Rivas, L. Defeating Leishmania resistance to miltefosine (hexadecylphosphocholine) by peptide-mediated drug smuggling: a proof of mechanism for trypanosomatid chemotherapy. *J. Control. Release.* **2012**, *161*, 835-842.
58. Abengózar, M. A.; Luque-Ortega, J. R.; Hornillos, V.; García de la Torre, B.; Fernández de Palencia, P.; Bart, J. M.; Nieto, C.; Navarro, M.; Acuña, U.; David, A.; Rivas, L. Cell penetrating peptides as nanotherapeutic tools against leishmania. Congreso II GEQB / XIV EPI. Bilbao, **2013**, P53.
59. Yamashita, H.; Demizy, Y.; Shoda, T.; Sato, Y.; Oba, M.; Tanaka, M.; Kurihara, M. Amphipathic short helix-stabilized peptides with cell-membrane penetrating ability. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 2403-2408.
60. Alzate J. F, Arias A., Mollinedo F., Rico E., de la Iglesia Vicente J., Jimenez Ruiz A. Edelfosine induces an apoptotic process in *Leishmania infantum* that is regulated by the ectopic expression of Bcl XL and Hrk. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 3779-3782.
61. Sundar, S.; Jha, T. K.; Thakur, C. P.; Engel, J.; Sindermann, H.; Fischer, C.; Junge, K.; Bryceson, A.; Berman, J. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *347*, 1739-1746.
62. Bhattacharya, S. K.; Sinha, P. K.; Sundar, S.; Thakur, C. P.; Jha, T. K.; Pandey, K.; Das, V. R.; Kumar, N.; Lal, C.; Verma, N.; Singh, V. P.; Ranjan, A.; Verma, R. B.; Anders, G.; Sindermann, H.; Ganguly, N. K. Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* **2007**, *196*, 591-598.
63. Palumbo, E. Oral miltefosine treatment in children with visceral leishmaniasis: A brief review. *Braz. J. Infect. Dis.* **2008**, *12*, 2-4.

CAPÍTULO 3: PEPTIDOMIMÉTICOS DE NATURALEZA NO PEPTÍDICA

3. PEPTIDOMIMÉTICOS DE NATURALEZA NO PEPTÍDICA

Como se ha comentado en capítulos anteriores los péptidos y peptidomiméticos sintetizados presentan propiedades farmacocinéticas desfavorables como la falta de permeabilidad entre otras.

Con el fin de evitar dichas propiedades desfavorables en el presente capítulo nos propusimos el diseño, síntesis y evaluación biológica de peptidomiméticos de naturaleza no peptídica, como inhibidores del proceso de dimerización de la TryR de *Leishmania infantum*, que presentaran mejores propiedades farmacocinéticas.

Para ello, en primer lugar se llevó a cabo un estudio en detalle de la región de la interfaz de dimerización donde interaccionan los péptidos, a fin de determinar cuáles son las contribuciones más relevantes para la interacción de los mismos en esta zona de la enzima. Además, en estudios teóricos previos al trabajo descrito en la presente Tesis Doctoral se determinó la contribución energética de cada uno de los residuos del péptido prototipo **P2**¹⁻² (Ac-PKIIQSVGISMKM-NH₂) a la energía libre de interacción entre el péptido y el monómero de la *Li*-TryR. En base a ello, se propuso un modelo de interacción del péptido **P2** en la interfaz de dimerización de *Li*-TryR que hemos utilizado en esta tesis doctoral para definir un modelo farmacofórico para la interacción de los péptidos en dicha interfaz de dimerización.

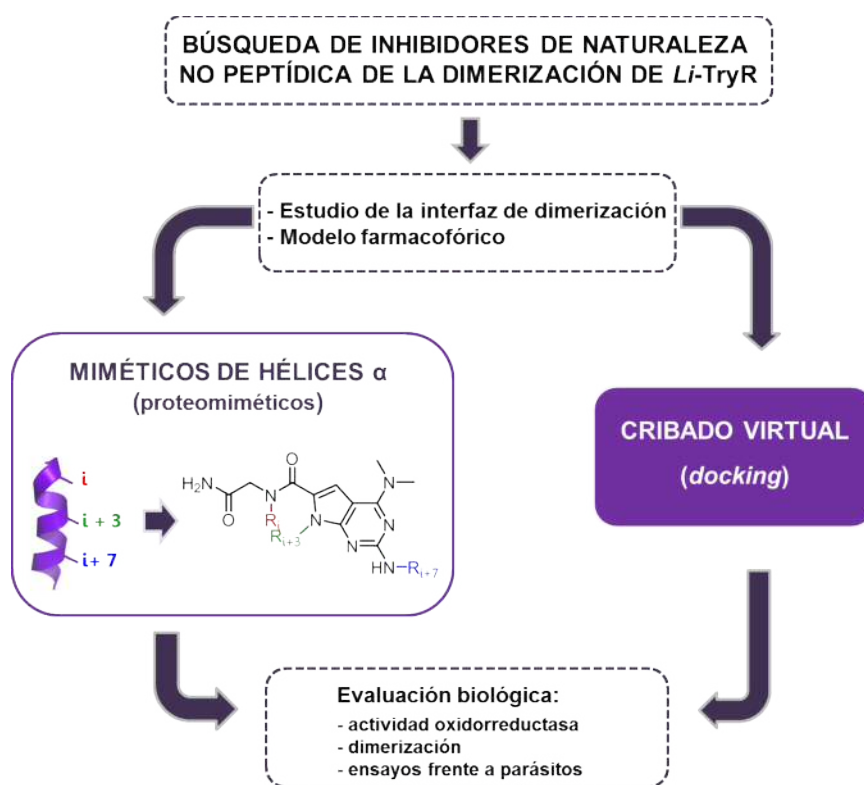


Figura 3.1. Objetivos del Capítulo 3.

Para la búsqueda de peptidomiméticos de naturaleza no peptídica hemos seguido dos estrategias diferentes (Figura 3.1). En la primera, hemos estudiado miméticos estructurales de hélices α (proteomiméticos), que constan de un esqueleto central en el que se introducen las cadenas laterales de los residuos importantes (i, i+3 e i+7) definidos en el modelo de interacción del péptido prototipo **P2** con el monómero de la proteína y localizados en la misma cara de la hélice α . De todos los posibles miméticos de hélices α descritos en la bibliografía, en este trabajo nos hemos centrado en el diseño, síntesis y evaluación biológica de pirrolopirimidinas, las cuales presentan un esqueleto rígido y preorganizado que permite situar las cadenas laterales en la disposición adecuada para una interacción favorable con la proteína. En la segunda aproximación, se ha realizado un cribado virtual, empleando dos quimiotecas de moléculas pequeñas, en el sitio de interacción de los péptidos, utilizando el modelo farmacofórico propuesto.

Todos los compuestos se han evaluado en ensayos enzimáticos de inhibición de la actividad oxidorreductasa y de la dimerización de la *Li*-TryR, así como en ensayos frente a parásitos en cultivo celular.

3.1. Estudio de la interfaz de dimerización

3.1.1. Análisis de las contribuciones hidrófobas y electrostáticas

El análisis de las contribuciones hidrófobas y electrostáticas en la interfaz de dimerización se realizó empleando el programa **cGRILL**³, que permite localizar las zonas de mayor afinidad para una sonda de naturaleza química dada en un sitio de unión. En concreto, cGRILL³ incorpora sondas de grupos aceptor o donador de enlace de hidrógeno, de grupo cargado positivamente, de grupo lipófilo y de grupo hidrófobo. Estas zonas se visualizan en forma de malla y los puntos de máxima afinidad o *hot spots* se representan en esferas. Así, en la Figura 3.2 se muestran las contribuciones importantes para la interacción en la interfaz de dimerización de *Li*-TryR, así como los *hot spots*, para los grupos hidrófobos, los grupos donador y aceptor de enlace de hidrógeno y los grupos cargados positivamente.

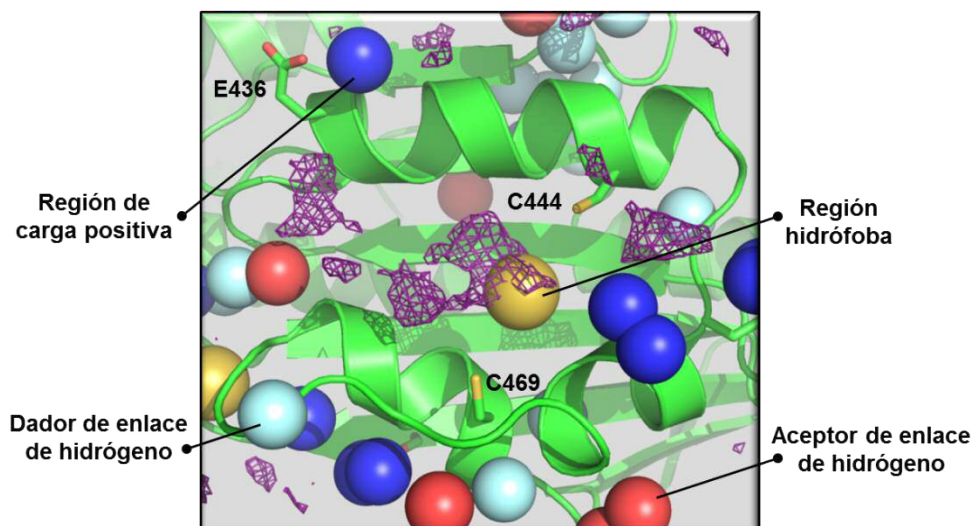


Figura 3.2. Análisis de la interfaz de dimerización de *Li-TryR* (estructura secundaria en verde) con la herramienta cGRILL. Se indican los *hotspots* en forma de esferas para los grupos hidrófobos (amarillo), grupos donador (rojo) y aceptor (azul celeste) de hidrógeno y grupo cargado positivamente (azul). Con la malla violeta se indican las regiones de afinidad por grupos hidrófobos.

El empleo de esta herramienta revela el gran peso que tiene la zona hidrófoba, rodeada por los residuos de Val441, Phe454 y Leu468 (Figura 3.3). En esta región es donde se aloja la cadena lateral del residuo de Ile9 de los péptidos descritos en esta Tesis, según el modelo de interacción que se detallará más adelante (Figura 3.6).

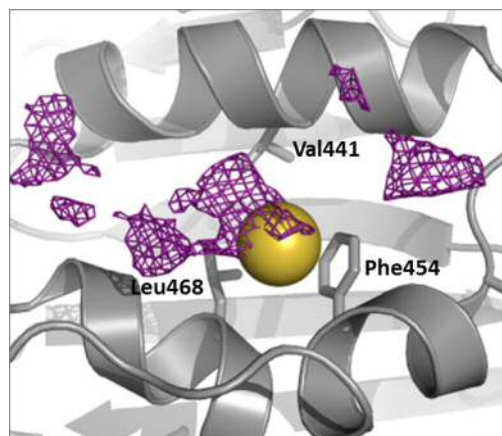


Figura 3.3. Análisis de la zona hidrófoba de la interfaz de dimerización, donde se entierra la Ile9.

3.1.2. Análisis de la superficie y volumen de la interfaz de dimerización

De forma complementaria, se analizaron las propiedades geométricas (superficie y volumen) de la interfaz de dimerización, utilizando para ello el servidor DoGSiteScorer⁴ y el programa fpocket⁵.

El servidor **DoGSiteScorer**⁴ (Universität Hamburg) permite detectar bolsillos en las proteínas en base a su tamaño, forma y naturaleza química, analizándolos en función de su mayor o menor tendencia de interacción con moléculas pequeñas (*druggability*).

De todos los bolsillos detectados con este servidor en el monómero de *Li-TryR*, el bolsillo P5 se sitúa en la interfaz de dimerización (Figura 3.4), en el lugar en el que se dispone la cadena lateral de la Ile9 del péptido prototipo **P2**. Además, DoGSiteScorer⁴ muestra que este bolsillo (P5) tiene una gran contribución hidrófoba (40%), hecho que concuerda con la predicción que se había obtenido con cGRILL³.

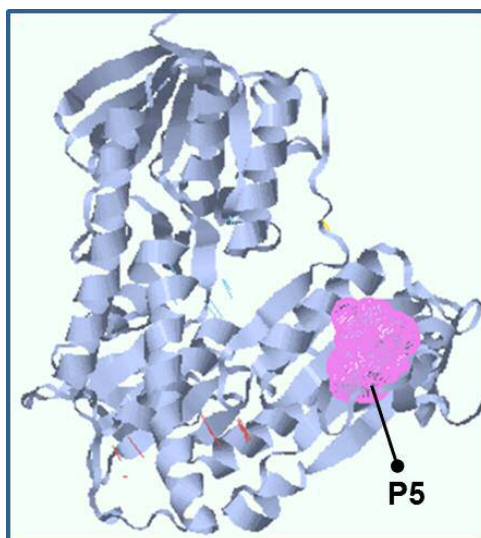


Figura 3.4. Resultado obtenido con DoGSiteScorer, en el que se puede ver el bolsillo P5 en el monómero de *Li-TryR*. Este bolsillo se localiza en la interfaz de dimerización en el hueco que da acomodo al residuo de Ile9 del péptido prototipo **P2**.

En paralelo, se realizó un estudio empleando el programa **fpocket**⁵. Este programa permite, al igual que el servidor DoGSiteScorer⁴, estudiar los diferentes bolsillos de la proteína, analizando el carácter hidrófobo o lipófilo, el tamaño y volumen de los mismos, etc. Como se puede ver en la Figura 3.5, existen siete bolsillos con carácter de *druggability*, que se representan en colores diferentes: P1 de color rojo, P2 de color azul oscuro, P3 de color verde, P4 de color gris, P5 de color rosa, P6 de color naranja y P7 de color azul celeste.

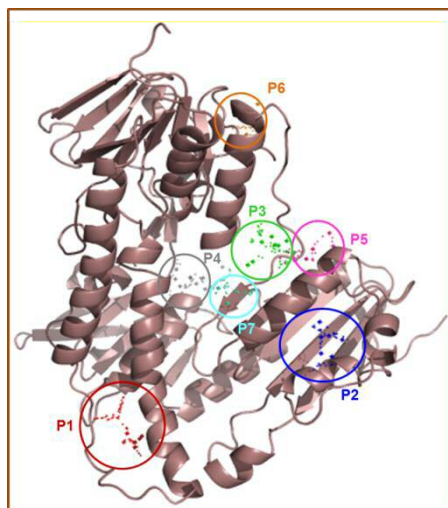


Figura 3.5. Resultado obtenido con fpocket, en el que se observan los diferentes bolsillos con carácter de *druggability* para la *Li-TryR*.

De todos ellos nos centramos en el bolsillo P2 (representado en la Figura 3.5 en color azul oscuro). Éste coincide con el hueco localizado en la interfaz de dimerización de *Li-TryR* y presenta una alta componente hidrófoba (84%).

El análisis de los resultados obtenidos del estudio de la interfaz de dimerización de *Li-TryR*, empleando tanto el servidor DoGSiteScorer⁴ como los programas cGRILL³ y fpocket⁵ indica que ésta posee un carácter altamente hidrófobo. Concretamente, la región hidrófoba, rodeada por los residuos de Val441, Phe454 y Leu468 de la proteína es la que presenta la mayor contribución a la interacción, y es precisamente en esta región donde se localiza el residuo de Ile9 de los péptidos estudiados.

3.2. Definición del modelo de farmacóforo

Como se ha mencionado, en trabajos previos a esta Tesis Doctoral, se realizaron estudios teóricos para determinar las contribuciones energéticas de cada residuo del péptido **P2** a la energía libre de interacción entre el péptido y el monómero de la TryR de *L. infantum*². De esta manera, se propuso el modelo de interacción del péptido **P2** en la interfaz de dimerización de la TryR que se muestra en la Figura 3.6.

Según este modelo, el péptido **P2** (verde) interaccionaría con el monómero de *Li-TryR* a través de interacciones de naturaleza electrostática (zona resaltada en color rojo) e hidrófoba (zona resaltada en morado). Cabe destacar cómo la Ile9 se alojaría

en el hueco hidrófobo de la Phe454, que había resultado ser uno de los *hot spots* más importantes en el análisis de la interfaz de dimerización comentado anteriormente.

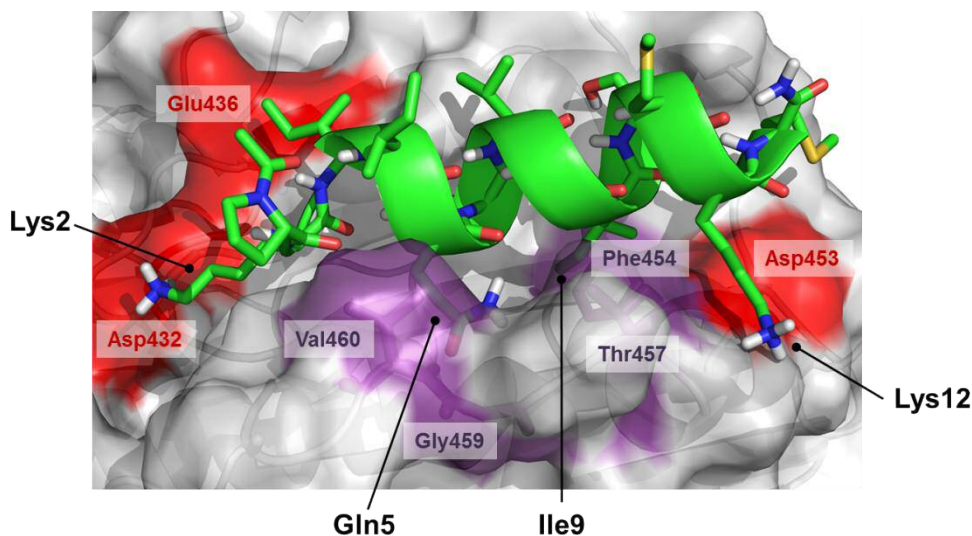


Figura 3.6. Modelo de interacción del péptido **P2** (verde) en la interfaz de dimerización de *Li-TryR* (gris).

En base a estos resultados y a los datos biológicos de los péptidos evaluados hasta el momento, se propuso un modelo de farmacóforo para la interacción de estos péptidos en la interfaz de dimerización (Figura 3.7). En concreto, se identificaron tres puntos farmacofóricos: (1) un grupo cargado positivamente (donde se encuentra la cadena lateral de la Lys2), (2) un donador de enlace de hidrógeno (bolsillo donde se localiza la Gln5), y (3) una región lipófila (donde se coloca la Ile9).

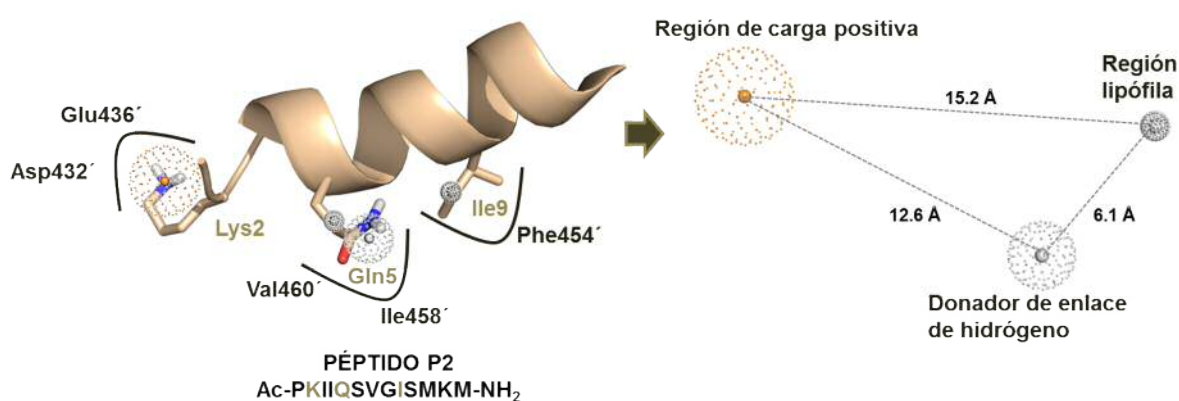


Figura 3.7. Modelo farmacofórico propuesto en base a la interacción del péptido **P2** y el monómero de la enzima en la interfaz de dimerización.

Los residuos de Gln5 e Ile9 se encuentran separados entre sí por una distancia aproximada de 6 Å, mientras que el residuo de Lys2 se encuentra a unas distancias

aproximadas de 12 Å y de 15 Å de los residuos de Gln5 e Ile9, respectivamente. La cadena lateral del residuo de Lys2 interaccionaría de manera muy efectiva con el carboxilato del residuo clave Glu436 (*hotspot*), y con el Asp432 mediante sendos enlaces de hidrógeno.

La importancia de estos residuos propuestos en el modelo farmacofórico fue corroborada experimentalmente mediante un *scanning* de alanina en la que los péptidos en los que se sustituyó uno a uno dichos residuos por residuos de Ala, mostraron una drástica disminución de su actividad, si no la pérdida, lo que demostró que dichos residuos eran claves en la interacción del péptido con la enzima.

Una vez definidos los residuos claves para la interacción (Lys2, Gln5 e Ile9) se llevó a cabo, por un lado, la búsqueda de proteomiméticos (miméticos estructurales de carácter no peptídico de hélices α), en base a esqueletos o *scaffolds* descritos en la bibliografía, y por otro, se realizó un cribado virtual en la interfaz de dimerización, empleando quimiotecas de moléculas pequeñas, en base al modelo de farmacóforo.

3.3. Miméticos estructurales no peptídicos de hélices α

Una de las estrategias más utilizadas en la búsqueda de peptidomiméticos⁶ de carácter no peptídico es el diseño de proteomiméticos o miméticos estructurales de hélices α , que pertenecen a los miméticos de Clase C mencionados en los antecedentes de esta Tesis, según la clasificación propuesta por Grossmann y colaboradores⁶. Esta estrategia consiste en reemplazar el esqueleto peptídico por un esqueleto o *scaffold* central, en el que se introducen las cadenas laterales de los residuos i , $i + 3$ ($i + 4$) e $i + 7$ de la cadena peptídica en la disposición adecuada para mimetizar la interacción del péptido con la proteína. Estos residuos se sitúan en la misma cara de la hélice α (Figura 3.8).

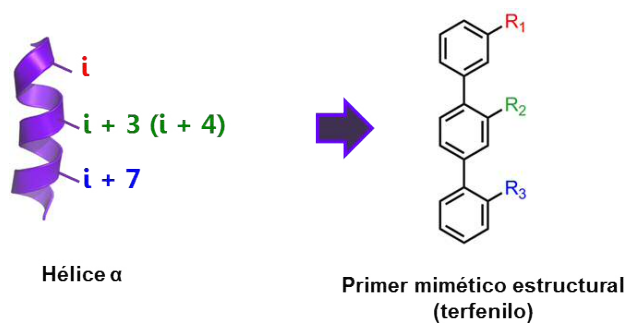
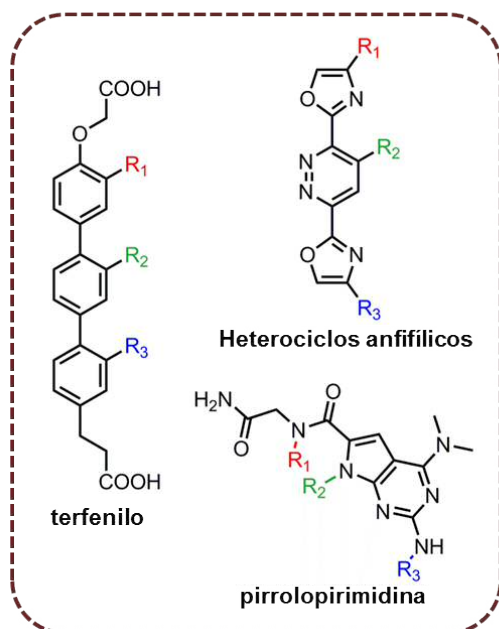


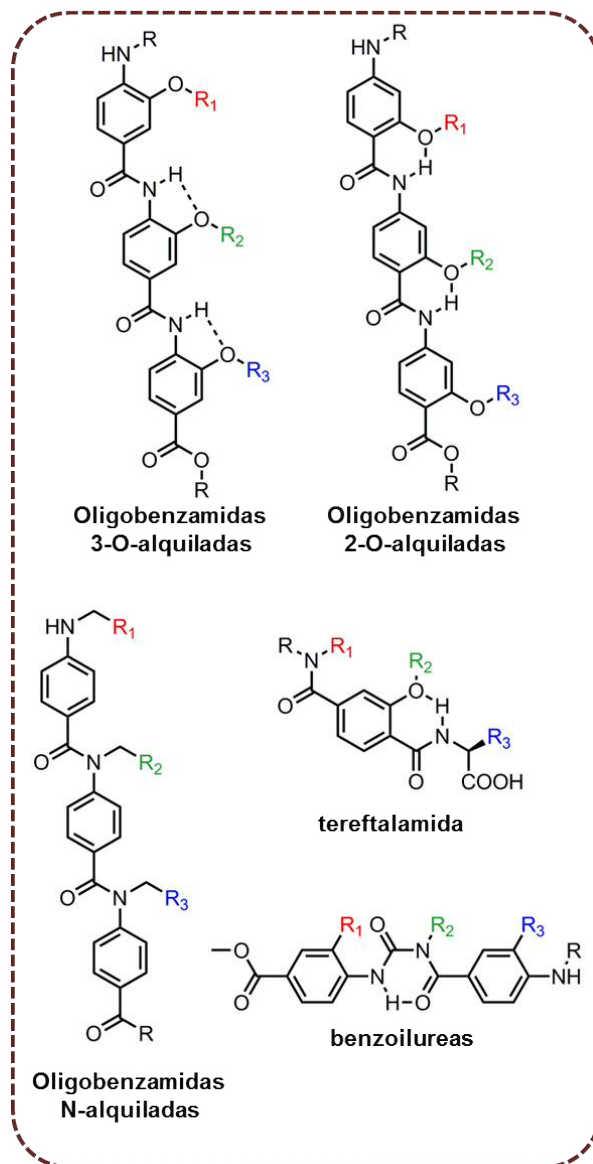
Figura 3.8. Representación de una hélice α con los residuos i , $i + 3$ ($i + 4$) e $i + 7$, y del primer mimético estructural: el terfenilo, donde R_1 , R_2 y R_3 son las cadenas laterales de los residuos i , $i + 3$ ($i + 4$) e $i + 7$ de hélices α .

El primer mimético de hélice α fue el esqueleto de trifenilo (terfenilo) (Figura 3.8), descrito por Hamilton y colaboradores⁷ en el año 2001, basado en estudios previos realizados por los grupos de Rees⁸ y Willems⁹, los cuales utilizaban indanos trisustituidos como inhibidores de receptores de taquicinas.

(1) Esqueletos con restricciones estéricas



(2) Esqueletos estabilizados a través de enlaces de hidrógeno intramoleculares



(3) Esqueletos con restricciones covalentes

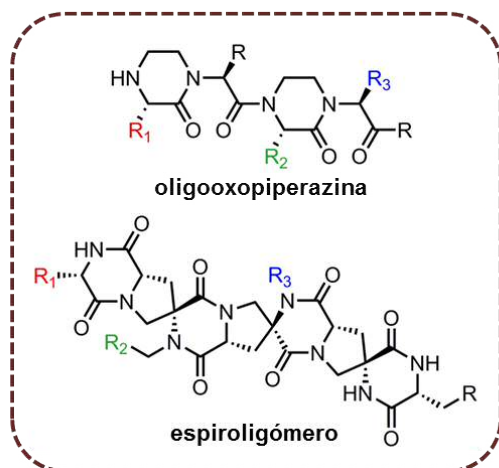


Figura 3.9. Ejemplos significativos de miméticos estructurales de hélices α según la clasificación de Grossmann y colaboradores⁶, donde R_1 es el residuo i , R_2 es el residuo $i + 3$ ($i + 4$) y R_3 es el residuo $i + 7$.

En la actualidad, existe una gran variedad de proteomiméticos o miméticos de Clase C descritos en la bibliografía¹⁰, a los que Grossmann y colaboradores⁶ agrupan en tres grandes grupos según el tipo de fuerzas que mantienen la rigidez

conformacional del esqueleto central para una adecuada orientación de los sustituyentes: (1) esqueletos con restricciones estéricas, (2) esqueletos estabilizados a través de enlaces de hidrógeno intramoleculares y (3) esqueletos con restricciones covalentes (Figura 3.9).

Dentro del primer grupo (esqueletos con restricciones estéricas) se encuentran los terfenilos, en los cuales las interacciones estéricas entre los sustituyentes situados en *orto* favorecen la no planaridad de los anillos aromáticos dando lugar a una orientación adecuada de los sustituyentes. Se han desarrollado inhibidores potentes de interacciones proteína-proteína (IPPs) basados en esqueletos de terfenilo⁷. Sin embargo, este tipo de compuestos requieren rutas sintéticas largas y tediosas, que implican la formación de muchos enlaces carbono-carbono. Además, los terfenilos son compuestos muy hidrófobos, con una solubilidad en agua muy baja. Así, con el fin de mejorar la solubilidad en agua y reducir la complejidad sintética, los anillos aromáticos del terfenilo han sido reemplazados por heterociclos de 5 ó 6 miembros, dando lugar a *scaffolds* de naturaleza anfifílica de mayor solubilidad en agua, y donde los factores estéricos, siguen siendo la contribución más importante para la preorganización espacial.¹¹⁻¹⁴ Posteriormente, en el año 2011 Lim y colaboradores^{15,16} diseñaron las pirrolopirimidinas, estructuras heterobíclicas que presentan la ventaja de ser rígidas y preorganizadas mimetizando de manera efectiva la orientación de los residuos i , $i + 3$ ($i + 4$) e $i + 7$ de hélices α . Estos compuestos presentan también una buena solubilidad en disoluciones acuosas. Finalmente, cabe destacar la facilidad sintética de estas estructuras, mediante síntesis en fase sólida, y su buena permeabilidad a través de membranas celulares.

En el segundo grupo de la clasificación de miméticos de hélices α (esqueletos estabilizados a través de enlaces de hidrógeno intramoleculares) cabe destacar las oligobenzamidas O- y N-alquiladas¹⁷, basadas en un esqueleto central de fenilos, que fueron descritas por Wilson y colaboradores^{18,19} como inhibidores efectivos de la interacción proteína-proteína del p53/HDM2.¹⁸⁻²⁰ En general, las oligoamidas han resultado ser unos inhibidores de IPPs menos potentes que los basados en esqueletos de terfenilos. Sin embargo, su mayor accesibilidad sintética mediante síntesis en fase sólida^{18,19} y la posibilidad de diversificación de sustituyentes aumentan la aplicabilidad de este tipo de esqueletos. En este segundo grupo también se encuentran las tereftalamidas, miméticos helicoidales con mayor rigidez, solubilidad acuosa, y menor complejidad sintética que los miméticos basados en el esqueleto de terfenilo.²¹ Así, empleando este esqueleto de tereftalamidas se han obtenido inhibidores potentes de

interacciones proteína-proteína, comparables a los basados en el esqueleto de terfenilo²¹. Otro tipo de esqueletos atractivos dentro de este grupo son las benzoilureas, estructuras fácilmente sintetizables, que dan lugar a compuestos solubles en agua y que constituyen los mejores miméticos de dos vueltas de la hélice α descritos hasta el momento.^{22,23} No obstante, hasta la fecha no se ha descrito ningún inhibidor de IPPs basado en este tipo de esqueleto.

Finalmente, respecto a los proteomiméticos del tercer grupo (esqueletos con restricciones covalentes) la característica más novedosa y valorable de este tipo de esqueletos es la quiralidad de las estructuras, lo que permitiría una mayor especificidad en la unión (*binding*). A este grupo pertenecen las oligooxopiperazinas²⁴ y los espiroligómeros²⁵.

En el trabajo descrito en este capítulo, nos centramos en la preparación de proteomiméticos basados en el esqueleto de pirrolopirimidina que, como ya se ha mencionado, es un esqueleto rígido y preorganizado, que presenta una buena solubilidad acuosa y permeabilidad celular. La síntesis en fase sólida de pirrolopirimidinas, tal y como describieron Lim y colaboradores^{15,16}, es sencilla y versátil, lo que les permitió obtener una quimioteca de compuestos de manera fácil y rápida a partir de aminas comerciales fácilmente asequibles y de gran diversidad estructural.

Para la elección de los residuos claves para la interacción con la proteína (*Li-TryR*) nos basamos en los estudios previos de las contribuciones energéticas de cada uno de los residuos de la α hélice de los péptidos prototipo comentados en el apartado 3.2, así como en los resultados del *scanning* de Ala, que fueron los residuos *i*, *i* + 3 e *i* + 7 (la Lys2, la Gln5 y la Ile9, respectivamente). Por tanto, como mimético estructural de hélice α nos planteamos la preparación de la pirrolopirimidina **3.01**, cuya estructura se recoge en la Figura 3.10.

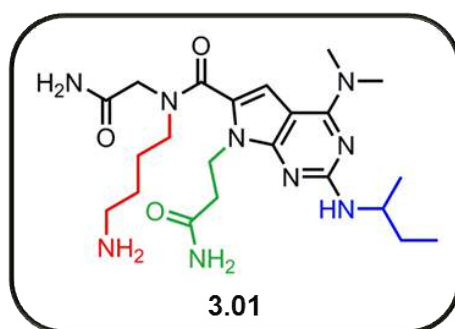


Figura 3.10. Pirrolopirimidina objetivo 3.01.

Una vez diseñado el mimético estructural (**3.01**) llevamos a cabo un estudio mediante técnicas de *docking* de la interacción de la pirrolopirimidina propuesta **3.01** con el monómero de la proteína para analizar de manera teórica si la disposición de las cadenas laterales de los residuos clave en la molécula objetivo (**3.01**) sería la adecuada para mimetizar la interacción del péptido con la proteína. Para llevar a cabo el *docking* se emplearon dos programas: AutoDock Vina²⁶ y Glide^{27,28}. En la Figura 3.11 se muestra el resultado de dicho *docking*.

Como se puede observar, en la pose reflejada en la figura, el compuesto **3.01** se coloca de manera adecuada para la interacción. Así, el sustituyente de la posición 2 de la pirrolopirimidina (que mimetizaría el residuo de Ile9) se orientaría hacia el nicho hidrófobo (malla morada), al igual que los péptidos prototipo. Por otra parte, el sustituyente que mimetizaría el residuo de Lys2 se dispondría de manera adecuada hacia el residuo de Glu436 del monómero de la proteína y el sustituyente del N7 que mimetizaría el residuo de Gln5 se dispondría hacia el esqueleto carbonado de los residuos de Ile458 y Val460 de la hélice de la proteína.

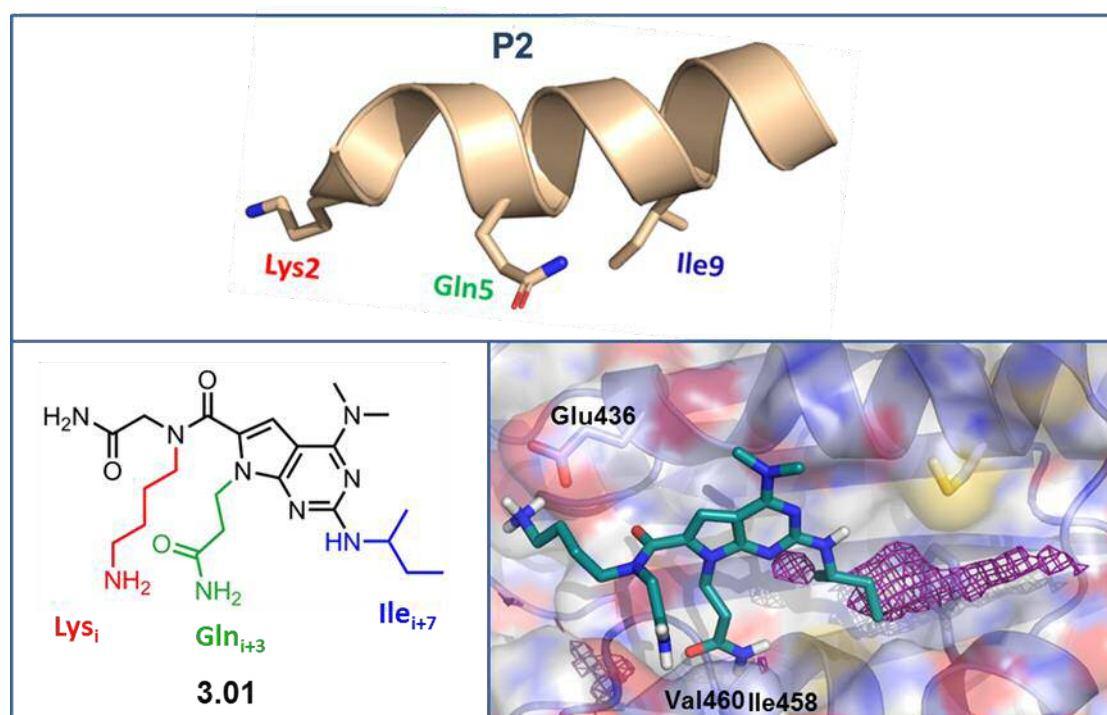
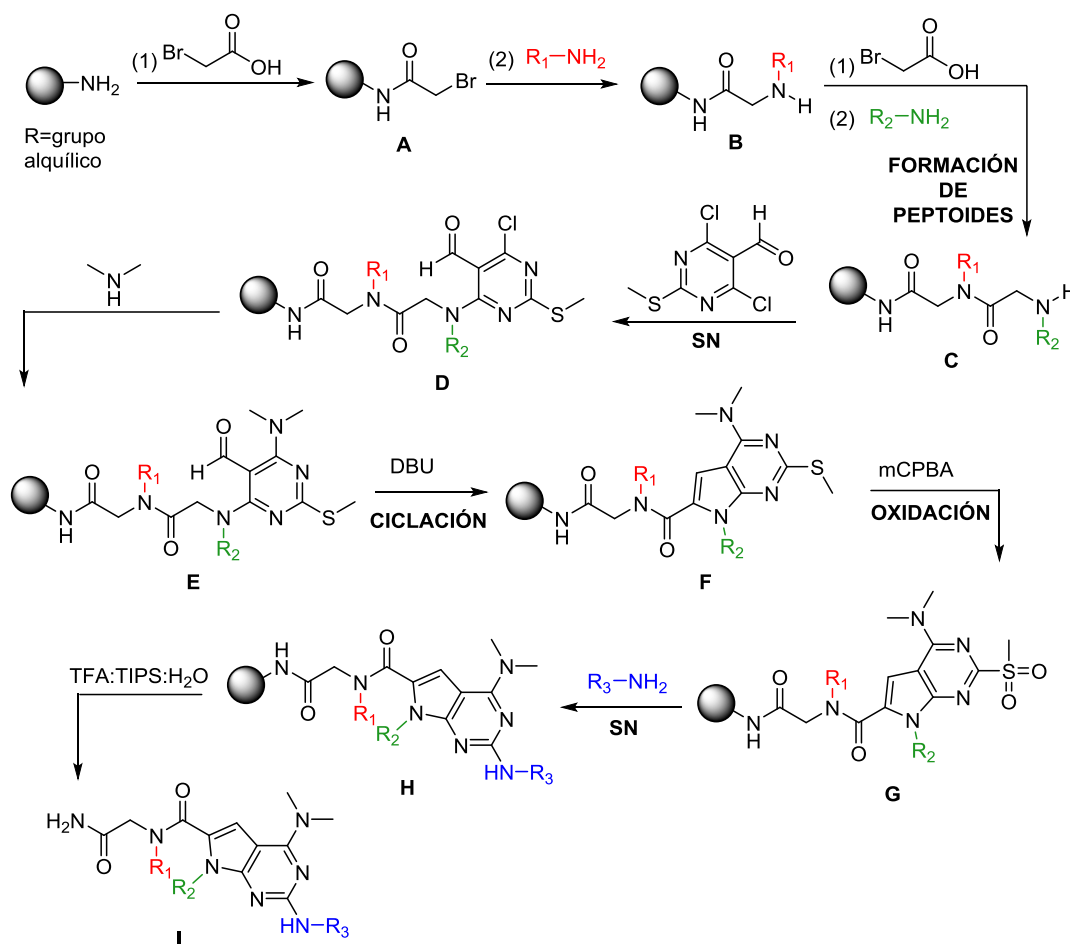


Figura 3.11. *Docking* de la pirrolopirimidina **3.01** objeto de estudio sobre el monómero de *Li-TryR*.

Estos resultados teóricos nos llevaron a considerar a la pirrolopirimidina **3.01** como un proteomimético prometedor, planteándonos por ello su síntesis y evaluación biológica.

3.3.1. Síntesis de la pirrolopirimidina 3.01

La síntesis de las pirrolopirimidinas se llevó a cabo en fase sólida siguiendo la metodología descrita por Lim y colaboradores^{15,16}, empleando una resina poliestirénica *MBHA* de tipo amida *Rink* de carga 0.56 mmol/g. El seguimiento de cada uno de los pasos se llevó a cabo por HPLC-MS tras el desanclaje de una pequeña parte de la resina.



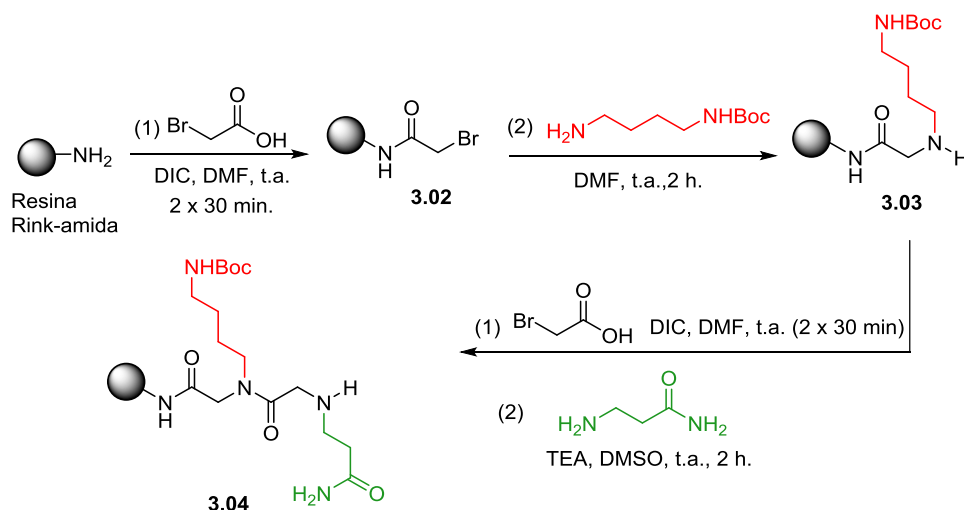
Esquema 3.1. Esquema general de síntesis en fase sólida de pirrolopirimidinas descrito por Lim y col.^{15,16}, donde R_1 es el residuo i , R_2 es el residuo $i + 3$ ($i + 4$) y R_3 es el residuo $i + 7$.

La síntesis reflejada en el Esquema 3.1 consta de los siguientes pasos clave: (1) formación del peptido **C** tras sucesivas reacciones con ácido bromoacético y reacción de sustitución nucleófila (SN) con las aminas comerciales que mimetizan las cadenas laterales de los residuos i e $i + 3$ ($i + 4$) (R_1 y R_2), (2) SN del peptido **C** con 4,6-dicloro-2-(metiltio)pirimidina-5-carbaldehído, (3) ciclación en medio básico para dar lugar al esqueleto de pirrolopirimidina **F**, (4) oxidación del grupo tiometilo de la posición 2 a la correspondiente metilsulfona **G**, para mejorar su capacidad como grupo saliente

y, (5) SN sobre dicho grupo con aminas que mimetizan la cadena lateral del residuo i + 7 (R_3).

Lim y col.^{15,16} realizaron la síntesis de una quimioteca de compuestos en los que principalmente se introducían cadenas laterales de residuos hidrófobos (Phe, Leu, Ile...). En nuestro caso, aplicaríamos esta metodología sintética para introducir cadenas que mimetizan residuos polares de Lys y Gln, que no habían sido utilizados por Lim y col., y que por tanto, suponían un reto sintético.

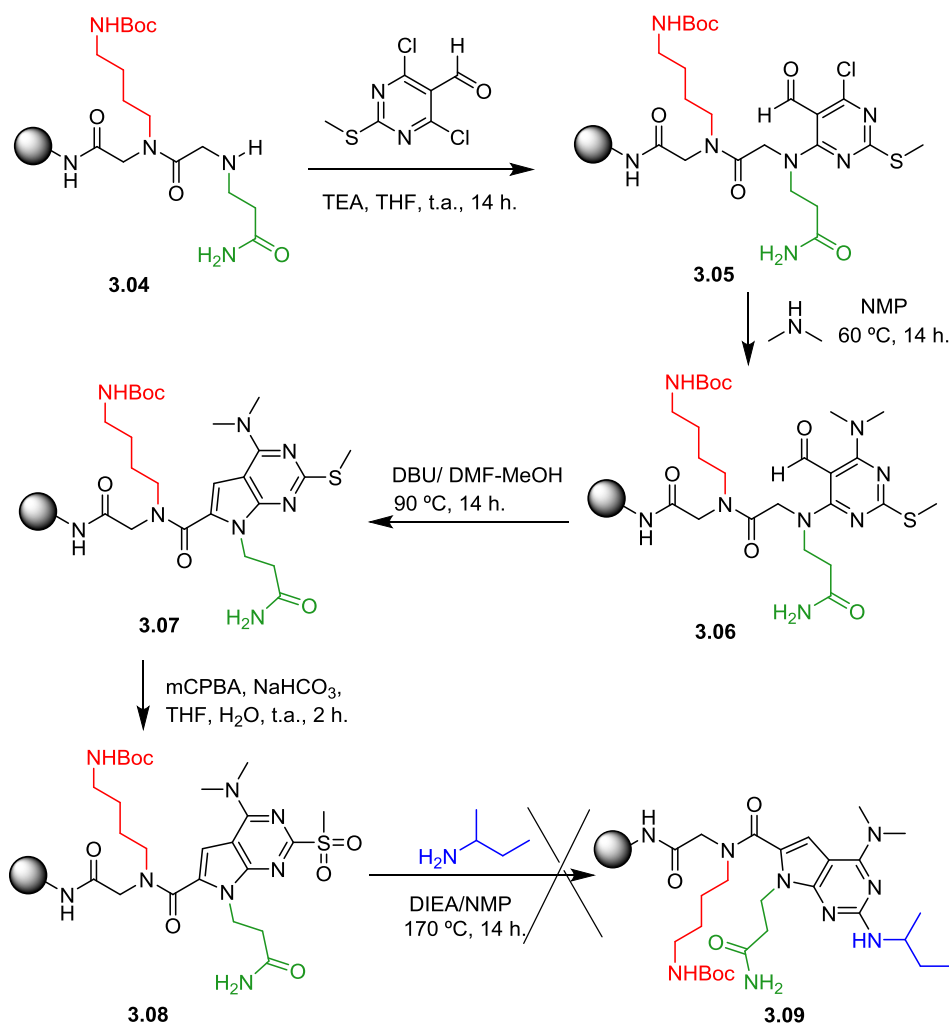
En primer lugar se llevó a cabo la síntesis del peptoide **3.04** (Esquema 3.2) a partir de aminas comerciales que mimetizarían los residuos de Lys2 (rojo) y de Gln5 (verde), respectivamente.



Esquema 3.2. Síntesis del peptoide **3.04**, portador de las cadenas laterales de los residuos de Lys2 y Gln5.

La síntesis de peptoides en fase sólida había sido puesta a punto por Olivos y colaboradores²⁹ en el año 2002. Así, siguiendo el protocolo descrito por estos autores²⁹, se hizo reaccionar una disolución de ácido bromoacético con diisopropilcarbodiimida (DIC) como agente de acoplamiento, en DMF anhidra durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, esta disolución del ácido activado se añadió a la resina, previamente hinchada en DMF, y se dejó reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente, repitiendo el proceso dos veces, dando lugar al bromo derivado intermedio **3.02**. Seguidamente, el intermedio **3.02** se hizo reaccionar con 20 equivalentes de *N*-Boc-1,4-butanodiamina (amina comercial que mimetiza la cadena lateral de la Lys2) en DMF anhidra durante dos horas a temperatura ambiente, obteniéndose el intermedio **3.03**. Como grupo protector del grupo amino se eligió el

grupo Boc, ya que podría eliminarse fácilmente en el medio ácido de la etapa final de desanclaje de la resina poliestirénica. De nuevo, se hizo reaccionar **3.03** con ácido bromoacético y DIC en DMF anhidra, y posteriormente se trató con 20 equivalentes de hidrocloreto de 3-aminopropanamida (amina comercial que mimetiza la cadena lateral del residuo de Gln5) y TEA, y se mantuvo durante dos horas a temperatura ambiente, detectándose por HPLC-MS la formación del peptoide deseado **3.04** (Esquema 3.2).



Esquema 3.3. Intentos iniciales de la síntesis del derivado **3.09** en fase sólida.

Una vez sintetizado el peptoide, la resina se hizo reaccionar con 4,6-dicloro-2-(metiltio)pirimidina-5-carbaldehído (5 equivalentes) y TEA (5 equivalentes) disueltos en THF y se mantuvo con agitación orbital a temperatura ambiente durante la noche, obteniéndose el intermedio **3.05** resultante de la SN de la amina sobre el 4-cloro del anillo de pirrolopirimidina (Esquema 3.3). El tratamiento de **3.05** con una disolución de dimetilamina 2.0 M en THF (20 equivalentes) y DIEA, con agitación orbital en un baño de silicona a 60 °C durante la noche, condujo al dimetilamino derivado **3.06**. El

tratamiento de **3.06** con 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) (20 equivalentes), a 90 °C durante la noche dio lugar a la ciclación, obteniéndose la pirrolopirimidina **3.07**. A continuación, se realizó una oxidación del grupo tiometilo a metilsulfona, mediante tratamiento de **3.07** con ácido *m*-cloroperbenzoico (10 equivalentes) y NaHCO₃ (15 equivalentes) en THF:H₂O (5:1), a temperatura ambiente durante la noche, obteniéndose **3.08** de manera satisfactoria como pudo observarse por HPLC-MS (Esquema 3.3).

El último paso de esta síntesis hacia la pirrolopirimidina objetivo implicaba una reacción de SN de la amina adecuada sobre el grupo metilsulfona de **3.08**. En nuestro caso utilizamos la *sec*-butilamina como mimético del residuo de Ile9. Sin embargo, los intentos iniciales empleando las condiciones descritas en la bibliografía (aminas en presencia de DIEA y NMP como disolvente a 170 °C en un tubo de presión durante la noche) no dieron lugar al compuesto deseado **3.09**, sino a una mezcla de productos de descomposición. En la Figura 3.12 se muestra el cromatograma obtenido por HPLC-MS de dicha reacción.

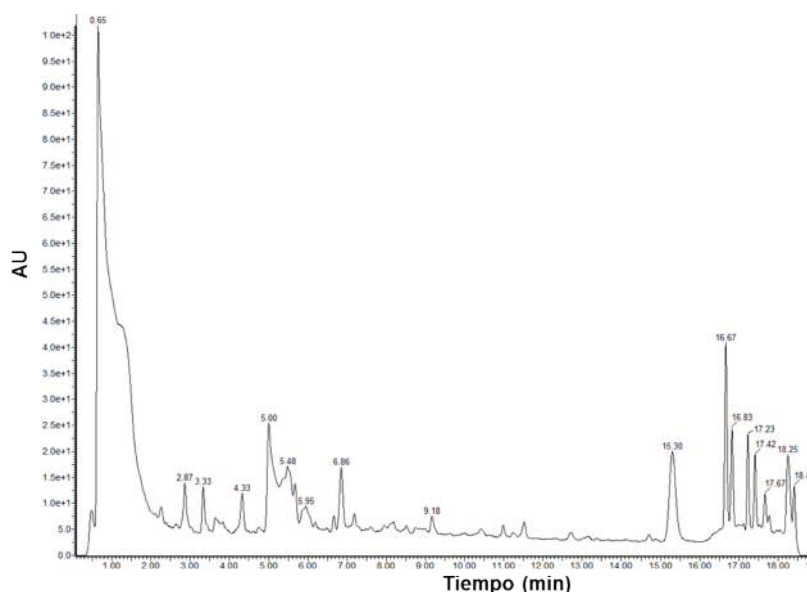


Figura 3.12. Cromatograma obtenido por HPLC-MS de la reacción de *sec*-butilamina con el intermedio **3.08** con DIEA a 170 °C (Gradiente 3 descrito en la parte experimental).

Cuando la reacción se llevó a cabo en un tubo de presión a temperaturas inferiores a 170 °C (160-170 °C) durante la noche, se detectó la formación de una pequeña cantidad de producto final **3.09**, siendo el producto mayoritario el intermedio de partida **3.08** (Figura 3.13).

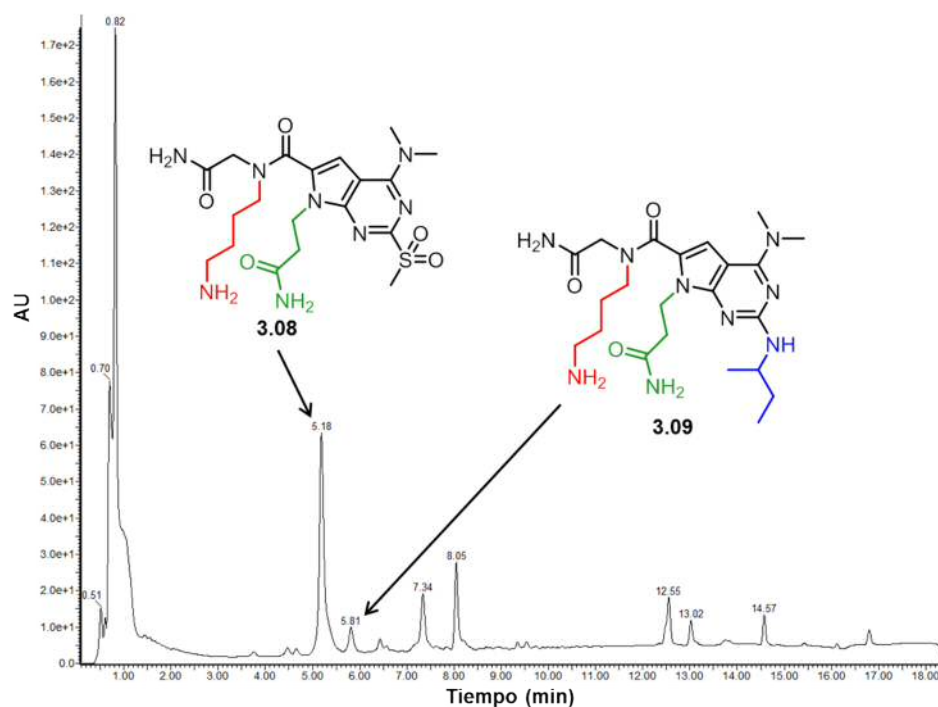


Figura 3.13. Cromatograma obtenido por HPLC-MS de la reacción de SN de **3.08** y *sec*-butilamina a temperaturas inferiores a 170 °C en tubo de presión (Gradiente 1 descrito en la parte experimental).

Con el fin de evitar la descomposición y mejorar la conversión de **3.08** al producto final **3.09** se realizaron diferentes pruebas empleando radiación de microondas a temperaturas y tiempos más cortos de reacción. Así, cuando la reacción se lleva a cabo a 150 °C en presencia de diferentes equivalentes de amina (20-100 equivalentes) y de base (100-300 equivalentes) durante 2 horas, únicamente se detectaron trazas del producto final, siendo el compuesto mayoritario el producto de partida **3.08**. Un aumento de la temperatura a 170 °C y del tiempo de reacción a 4 horas condujo a una conversión del 50% al producto final (**3.09**) (Figura 3.14A). Cuando en estas condiciones el tiempo de reacción se elevó a 5 horas, se observó un aumento de conversión al producto final (Figura 3.14B). Sin embargo, en el cromatograma de HPLC-MS pudo observarse que la absorbancia de este compuesto era muy baja, lo que podría indicar bajas concentraciones del mismo. Este hecho se confirmó al intentar aislar y purificar este compuesto, ya que sólo se obtuvieron trazas del producto deseado que impidieron su caracterización.

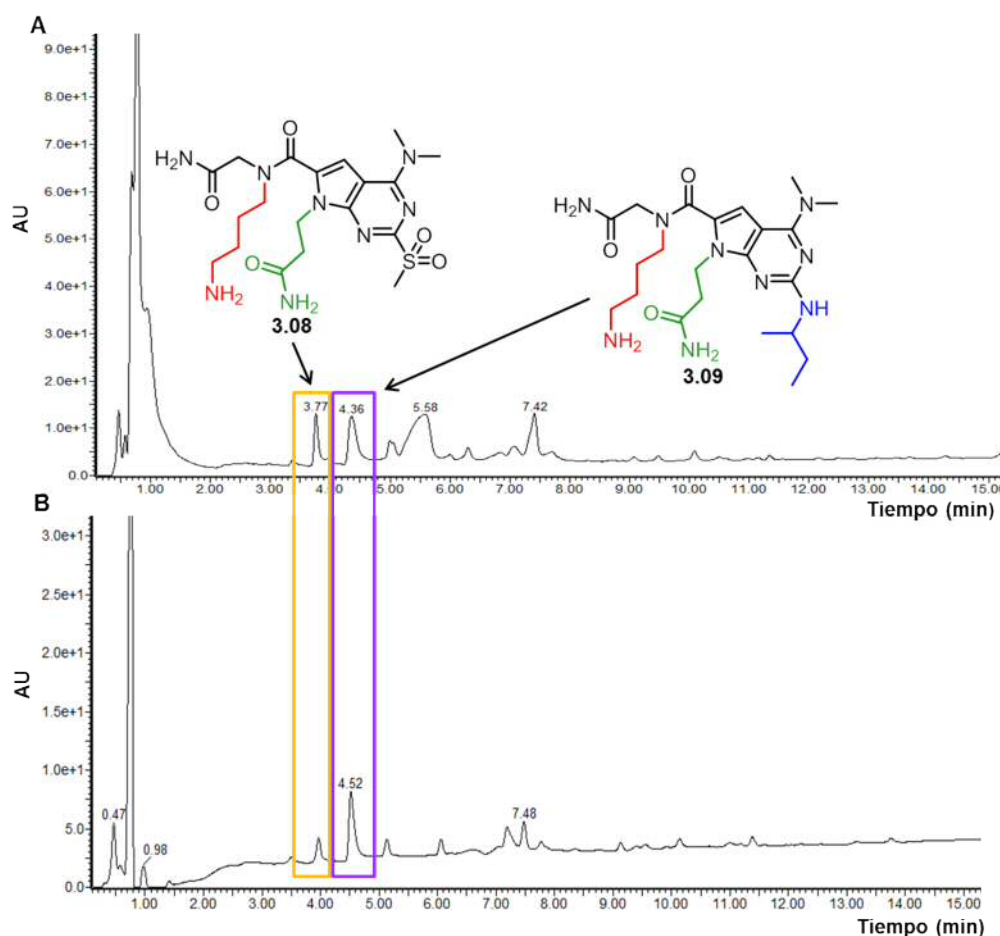


Figura 3.14. Cromatogramas de HPLC-MS obtenidos en la reacción de *sec*-butilamina y **3.08** por irradiación en microondas a 170 °C durante: A) 4 horas (Gradiente 3 descrito en la parte experimental) y B) 5 horas (Gradiente 3 descrito en la parte experimental).

Estos resultados nos hicieron pensar en la posibilidad de que el hecho de utilizar la 3-aminopropanamida con el grupo amida libre (residuo i + 4) a temperaturas tan altas, fuera el causante de los problemas de descomposición observados. Como alternativa, nos planteamos la preparación del compuesto **3.10** (Figura 3.15), portador de una amida cíclica como mimético de la cadena lateral de la Gln en lugar de la amida libre, ya que esta amida había sido utilizada por Lim y colaboradores^{15,16} en la librería de pirrolopirimidinas obtenida a partir de este mismo procedimiento sintético en fase sólida.

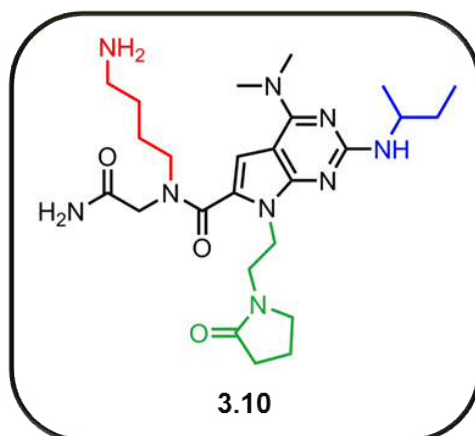
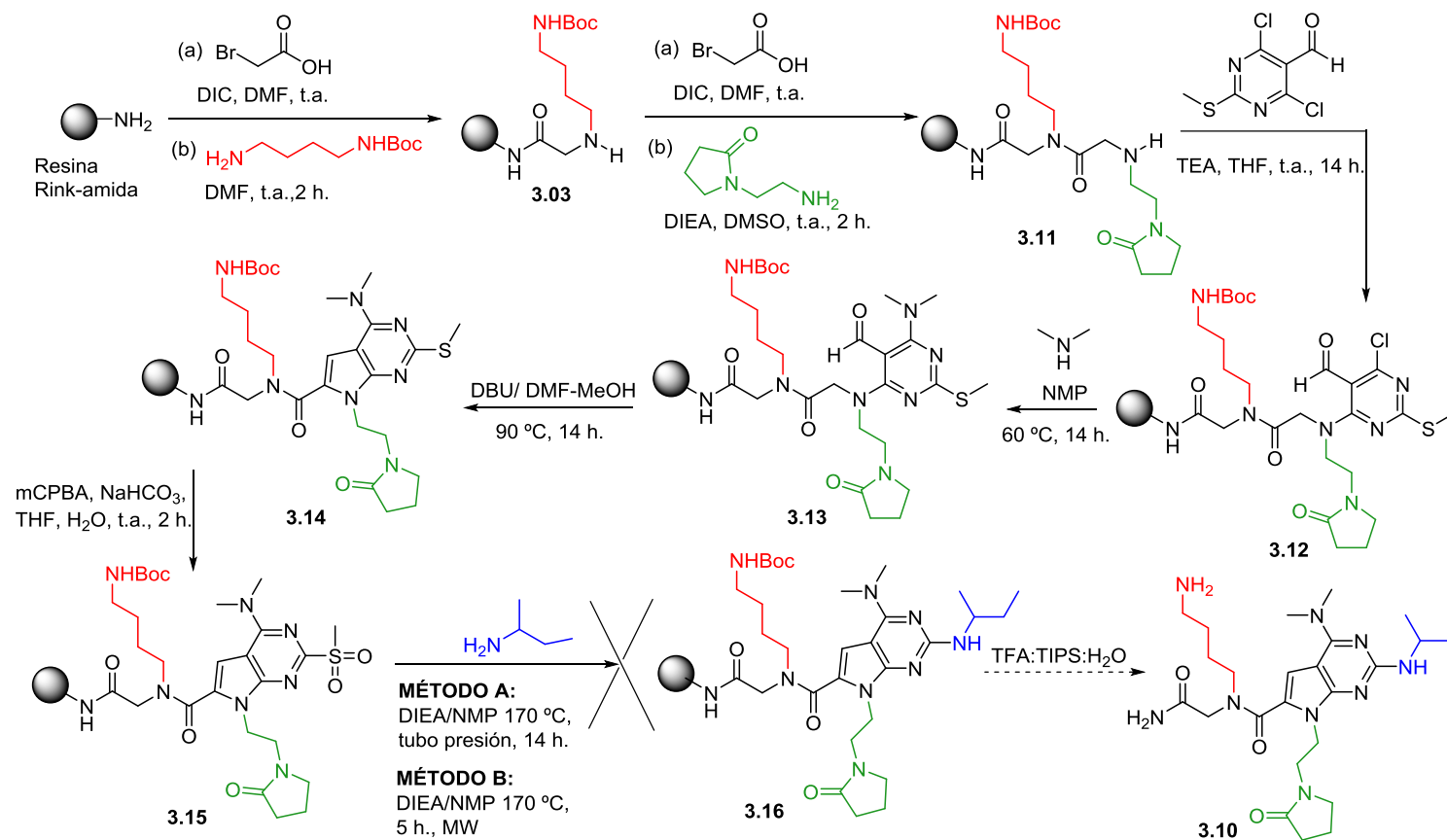


Figura 3.15. Estructura de la pirrolopirimidina **3.10** portadora de una amida cíclica.

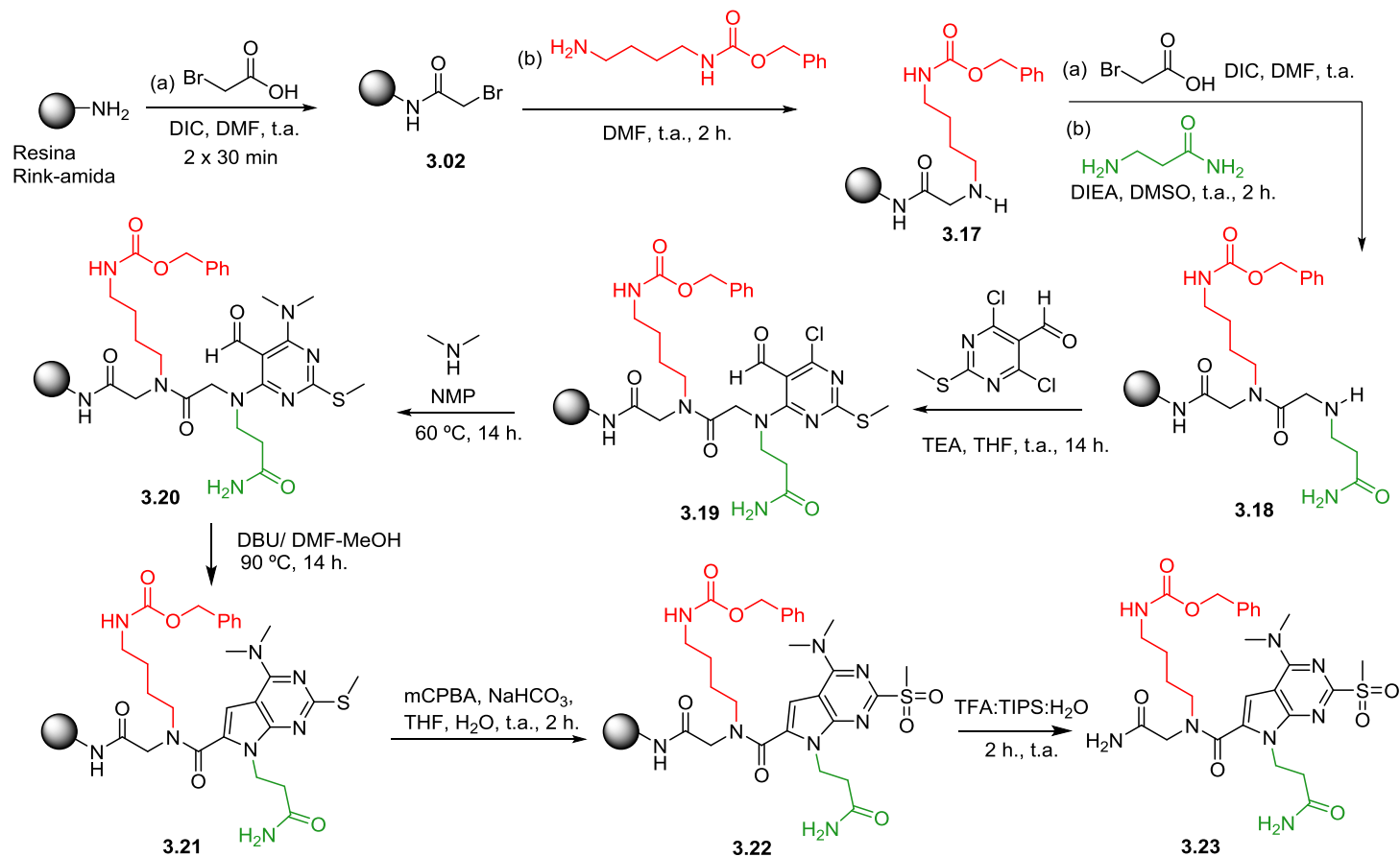
La síntesis de este nuevo compuesto se llevó a cabo siguiendo una metodología similar a la descrita anteriormente, tal y como se refleja en el Esquema 3.4, utilizando *N*-(3-aminopropil)-2-pirrolidinona comercial en la síntesis del peptóide **3.11**.

La síntesis se llevó a cabo de manera satisfactoria hasta la obtención del compuesto de metilsulfona intermedio **3.15**, empleando las mismas condiciones sintéticas descritas para la obtención del compuesto **3.08**. Desafortunadamente, todos los intentos de SN de **3.15** con *sec*-butilamina, tanto utilizando el método A (tubo de presión a 170 °C durante la noche) como con el método B (microondas a 170 °C durante 5 h.), condujeron a productos de descomposición, no siendo posible la obtención de la pirrolopirimidina deseada **3.10**.

Seguidamente, con el fin de realizar la última etapa de síntesis (SN) de **3.15** en condiciones más suaves, y así evitar la descomposición, llevamos a cabo esta reacción en disolución a partir del intermedio **3.23** (Esquema 3.5), obtenido en fase sólida. En este nuevo procedimiento se combina tanto la síntesis en fase sólida como la síntesis en disolución. Para ello fue necesario sustituir el grupo protector Boc del grupo amino por un grupo carbobenciloxi (Cbz) que no se desprotegiese en medio ácido en la etapa de desanclaje, con el fin de mantener protegido el grupo amino que mimetiza la cadena lateral del residuo de Lys2 en la última etapa de síntesis en disolución. Las primeras etapas de esta nueva ruta sintética se llevaron a cabo en fase sólida de manera similar a las descritas anteriormente, según se refleja en el Esquema 3.5. La amida empleada en esta ruta fue la 3-aminopropanamida, ya que tal y como se ha visto en los estudios anteriores, no se habían observado diferencias entre el empleo de esta amida o el de la amida cíclica.

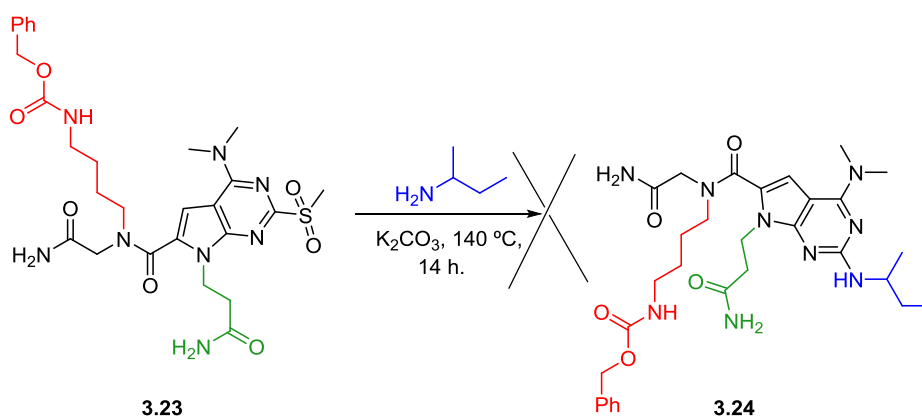


Esquema 3.4. Intentos de síntesis de la pirrolopirimidina **3.10** empleando la amida cíclica *N*-(3-aminopropil)-2-pirrolidinona.

Esquema 3.5. Síntesis en fase sólida del intermedio **3.23**.

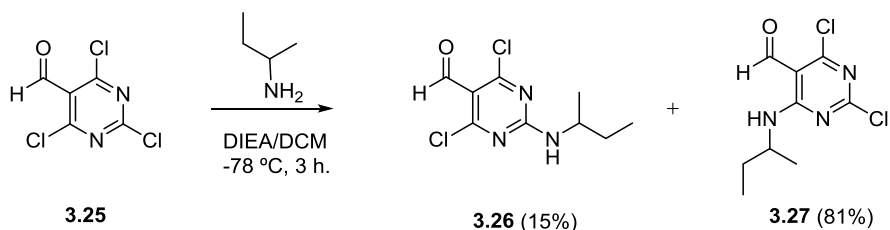
Una vez realizadas todas las etapas de síntesis en fase sólida, y tras el desanclaje en condiciones ácidas de la resina y su posterior purificación mediante cromatografía en fase reversa en un equipo Biotage®, se obtuvo el intermedio deseado **3.23** con un rendimiento global del 10%.

A continuación, y como se ha comentado, se llevó a cabo el último paso de la ruta sintética en disolución, mediante el tratamiento del intermedio **3.23** con la amina deseada (*sec*-butilamina) y K_2CO_3 como base a 140 °C durante la noche (Esquema 3.6). Estas condiciones habían sido utilizadas por Clark y colaboradores en la síntesis de pirrolopirimidinas en disolución descrita en 2007.³⁰ Sin embargo, nuevamente no se detectó la formación del producto de SN deseado **3.24**, observándose la aparición de productos de descomposición.



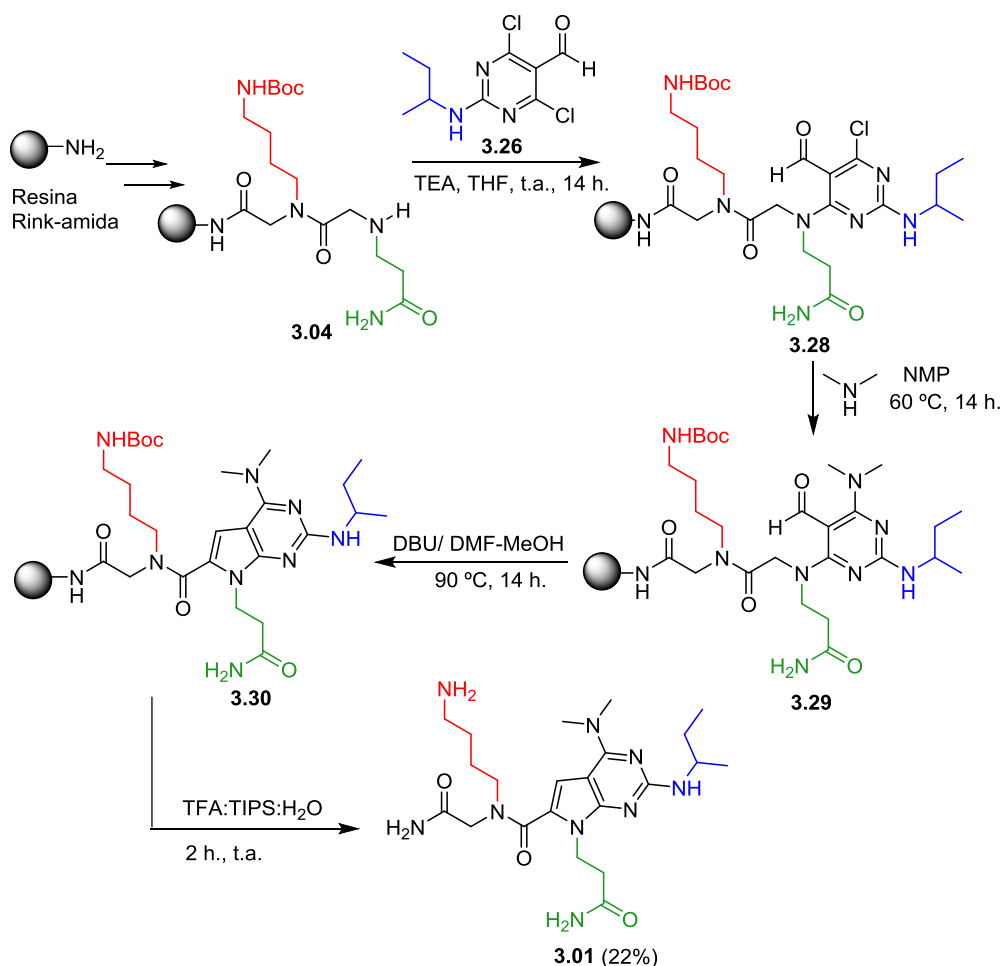
Esquema 3.6. Reacción del intermedio de pirrolopirimidina **3.23** con *sec*-butilamina y K_2CO_3 en disolución.

A la vista de estos resultados, se planteó una ruta alternativa que consistía en la introducción del residuo mimético de Ile9 en disolución a partir del 2,4,6-tricloropirimidina-5-carbaldehído comercial (**3.25**) (Esquema 3.7) previo a la etapa de ciclación en fase sólida. Así, el tratamiento de este reactivo comercial con *sec*-butilamina en presencia de DIEA como base en DCM seco a -78 °C durante 3 horas condujo a la mezcla de los isómeros **3.26** y **3.27**, resultantes de la sustitución de los átomos de Cl en las posiciones 2 y 4, respectivamente, que fueron separados cromatográficamente. El compuesto deseado **3.26** (2-(*sec*-Butilamino)-4,6-dicloropirimidina-5-carbaldehído) se obtuvo en un 15% de rendimiento, mientras que el **3.27** (4-(*sec*-Butilamino)-2,6-dicloropirimidina-5-carbaldehído), resultante de la sustitución del cloro de mayor reactividad, se obtuvo en un 81% de rendimiento tras purificación cromatográfica.



Esquema 3.7. Síntesis de los isómeros **3.26** y **3.27** a partir del reactivo comercial **3.25**.

Una vez obtenido el intermedio **3.26** se realizó la síntesis en fase sólida de la pirrolopirimidina objetivo **3.01** siguiendo un procedimiento similar al empleado anteriormente (Esquema 3.8).



Esquema 3.8. Síntesis de la pirrolopirimidina final **3.01**.

En este caso se puede observar que se han eliminado dos pasos de reacción, el último paso de introducción de la *sec*-butilamina y la oxidación del grupo tiometilo a metilsulfona. Así, el tratamiento del peptido **3.04** con el intermedio **3.26** en presencia

de TEA, seguido de reacción con dimetilamina y ciclación en medio básico condujo a la formación de la pirrolopirimidina anclada a la resina **3.30**. Tras desanclaje de la misma y purificación del residuo final mediante cromatografía en fase reversa en el Biotage® se pudo obtener el producto final deseado **3.01** con un rendimiento global del 22% tras purificación cromatográfica.

Siguiendo esta metodología, nos planteamos la posibilidad de introducir modificaciones en los sustituyentes que mimetizan las cadenas laterales de los residuos de las posiciones i , $i + 3$ e $i + 7$. Así, en este trabajo nos centramos en la sustitución de la posición 2 del anillo de pirrolopirimidina (posición $i + 7$) por grupos hidrófobos de diferente naturaleza, como se verá en la Figura 3.17.

3.3.2. Diseño y síntesis de pirrolopirimidinas modificadas en la posición 2

Como ya se mencionó al principio de este capítulo, el análisis de la interfaz de dimerización mostró el gran carácter hidrófobo e importancia de la región de la enzima definida por los residuos de Val441, Phe454 y Leu468 en las interacciones de dicha interfaz. Es en esta zona donde se localizaba la cadena lateral del residuo de Ile9 de los péptidos descritos en esta Tesis Doctoral, y por extensión, el sustituyente de la posición 2 de la pirrolopirimidina **3.01**. Los estudios de *docking* de **3.01** sobre el monómero de *Li-TryR* (Figura 3.16) muestran que el hueco hidrófobo donde se alojaría el grupo *sec*-butilo de la posición 2 es grande, quedando dicho grupo a una distancia de aproximadamente 6 Å de la Phe454.

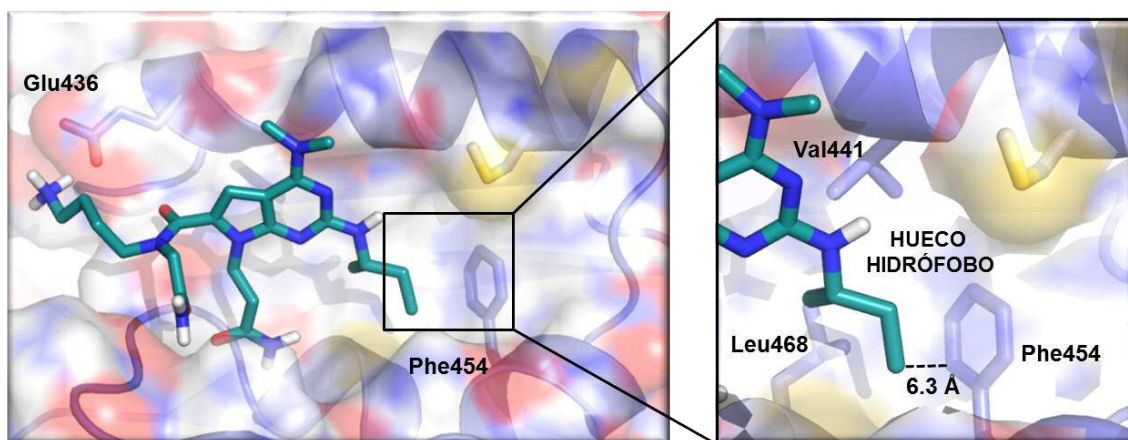


Figura 3.16. Imagen del *docking* de **3.01** sobre el monómero de *Li-TryR*.

Con el fin de aumentar la interacción de la pirrolopirimidina en esta zona de la enzima se planteó la preparación de pirrolopirimidinas de fórmula general **I**, portadoras de grupos hidrófobos de distinta naturaleza en la posición 2, como son un grupo pirrolidina, isobutilo o bencilo (Figura 3.17). En el caso del grupo bencilo, éste podría dar lugar a interacciones de tipo π -stacking con la Phe454.

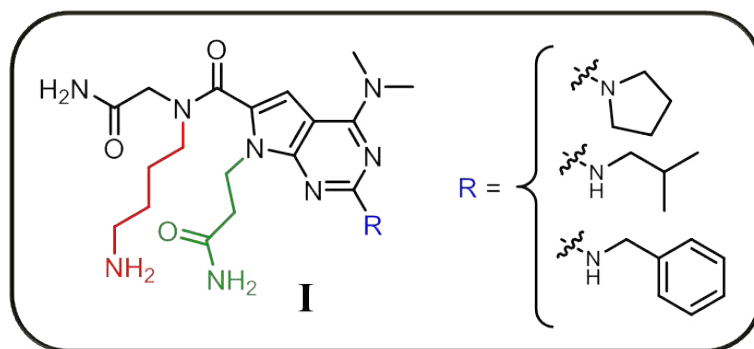


Figura 3.17. Fórmula general de pirrolopirimidinas sustituidas en la posición 2.

Para la síntesis de estas pirrolopirimidinas fue necesario disponer de los intermedios **3.31-3.33** (Figura 3.18). El intermedio **3.31** se obtuvo de fuentes comerciales, mientras que los 4,6-cloro intermedios **3.32** y **3.33** hubo que sintetizarlos.

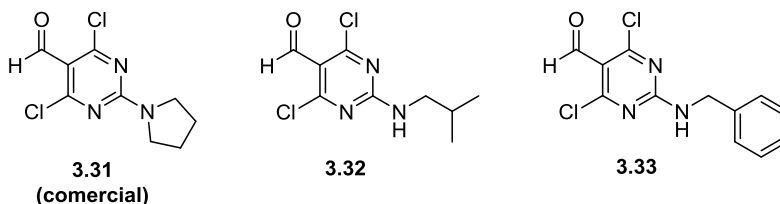
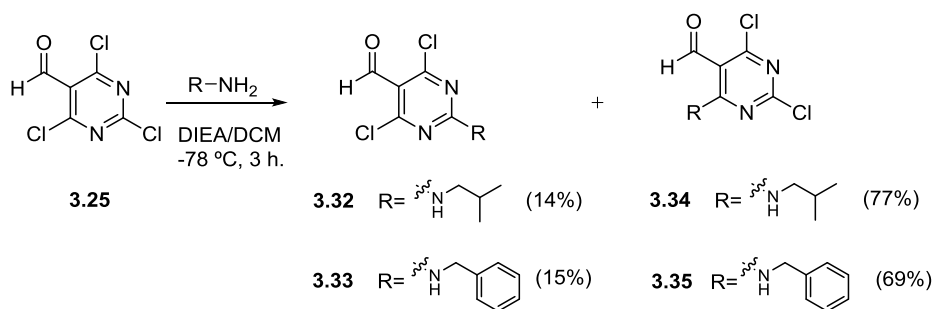


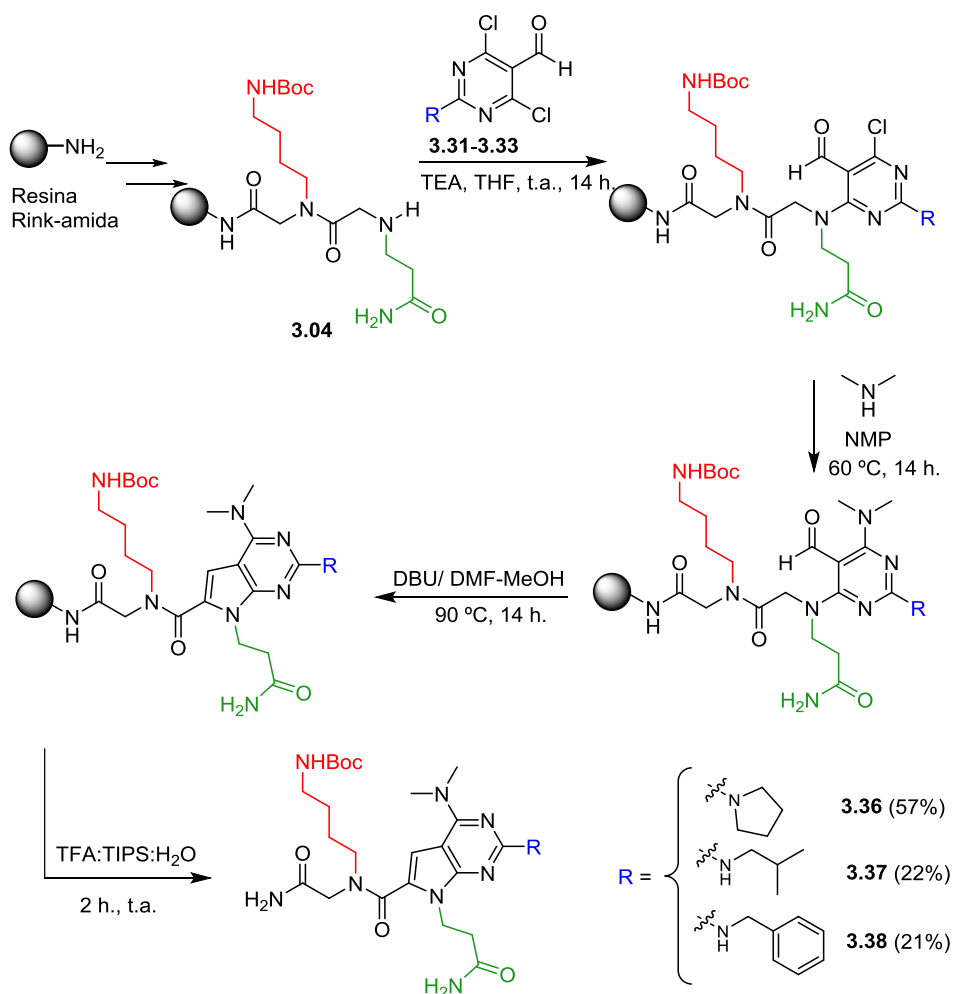
Figura 3.18. Intermedios **3.31**, **3.32** y **3.33** necesarios para la síntesis de nuevas pirrolopirimidinas.

La síntesis de estos intermedios se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de aminación del tricloro derivado (**3.25**) descrito en el Esquema 3.7. Así, el tratamiento de **3.25** con isobutilamina y bencilamina en presencia de DIEA a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ condujo a la mezcla de dos isómeros (**3.32**, **3.34** y **3.33**, **3.35**, respectivamente) (Esquema 3.9), que fueron separados cromatográficamente obteniéndose en los rendimientos reflejados en el Esquema 3.9.



Esquema 3.9. Síntesis de los intermedios 3.32-3.35.

Una vez sintetizados los intermedios 3.32 y 3.33, se llevó a cabo la síntesis en fase sólida de las pirrolopirimidinas 3.36, 3.37 y 3.38 (Esquema 3.10), siguiendo una metodología similar a la descrita para 3.01, obteniéndose los compuestos deseados con rendimientos globales comprendidos entre el 21-57%.



Esquema 3.10. Síntesis de las pirrolopirimidinas 3.36, 3.37 y 3.38.

Las pirrolopirimidinas sintetizadas presentan en su estructura un enlace amida *N,N*-disustituido que podría dar lugar, al tratarse de sustituyentes diferentes, al conocido fenómeno de rotamería *E/Z* debido a la restricción de la libre rotación en torno al enlace N-CO impuesta por la conjugación entre el átomo de nitrógeno y el carbonilo. La velocidad de intercambio entre rotámeros es un proceso relativamente lento en la escala de tiempos de la RMN lo que puede dar lugar a la aparición de dos grupos de señales en los espectros de RMN a temperatura ambiente cuando la velocidad de intercambio es lenta, o al ensanchamiento de señales, a velocidades de intercambio intermedias. Así, de modo general, cuando los espectros de ^1H -RMN se realizan a distintas temperaturas (estudio de RMN dinámica) se puede observar, a temperaturas altas, el fenómeno de coalescencia donde un intercambio rápido entre los dos rotámeros da lugar a un afinamiento de las señales.

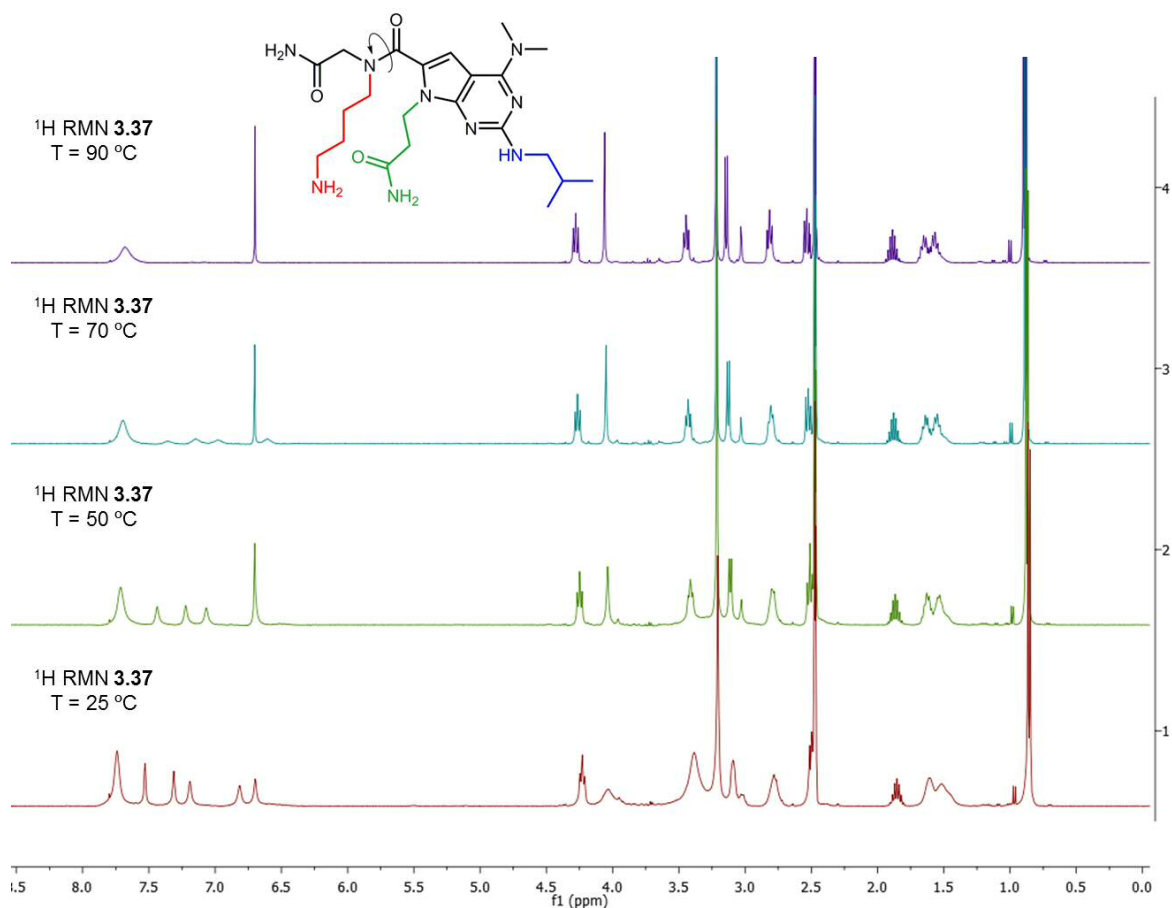


Figura 3.19. Espectros de ^1H -RMN de la molécula **3.37** a diferentes temperaturas.

Los espectros de ^1H -RMN a temperatura ambiente de las pirrolopirimidinas sintetizadas mostraron un ensanchamiento de las señales, principalmente en las

señales de los protones cercanos al enlace amida terciaria, que podría atribuirse a la presencia de rotámeros *E/Z* con una velocidad de intercambio intermedia. Con el fin de facilitar su caracterización, se realizaron los espectros de ^1H -RMN a distintas temperaturas. En la Figura 3.19 se muestran como ejemplo representativo los espectros de ^1H -RMN del compuesto **3.37** a 50 °C, 70 °C y 90 °C. En este estudio se observa que a temperaturas altas (90 °C) las señales coalescen a una sola observándose el afinamiento de las señales.

Así, todos los espectros de ^1H -RMN de las pirrolopirimidinas sintetizadas se llevaron a cabo a 90 °C para su caracterización estructural.

3.3.3. Evaluación biológica de las pirrolopirimidinas

Las pirrolopirimidinas sintetizadas (**3.01**, **3.36**, **3.37** y **3.38**) así como los intermedios de tiometilo y metilsulfona (**3.14** y **3.23**) obtenidos anteriormente fueron evaluados en ensayos enzimáticos de inhibición de la actividad oxidorreductasa y de dimerización de la TryR de *L. infantum* por el grupo del Dr. Antonio Jiménez de la Universidad de Alcalá.

En la Tabla 3.1 se recogen los datos de actividad oxidorreductasa (CI_{50} act.) y de dimerización (CI_{50} dim.) obtenidos para dichas pirrolopirimidinas, así como para los péptidos prototipo **P2** y **1.01**.

Tabla 3.1. Datos biológicos de las pirrolopirimidinas **3.01**, **3.36**, **3.37** y **3.38** y los prototipos **P2** y **1.01**.

Compuesto	CI_{50} act. (μM)*	CI_{50} dim. (μM)*
3.14	>200	-
3.23	>200	-
3.01	>200	>75
3.36	>200	>75
3.37	>200	>75
3.38	156 \pm 40	21.97 \pm 0.37
P2	1.84 \pm 0.28	17.88 \pm 0.55
1.01	1.50 \pm 0.15	7.04 \pm 0.56

* Concentración inhibitoria necesaria para inhibir al 50% la actividad de la enzima.

Los datos biológicos mostraron que los compuestos **3.14** y **3.23** resultaron inactivos en el ensayo de actividad oxidorreductasa, por lo que, al no tratarse de productos finales, no fueron evaluados en el ensayo de dimerización.

Por otro lado, las pirrolopirimidinas **3.01**, **3.36** y **3.37** fueron inactivas tanto en el ensayo de actividad como en el de dimerización. Sin embargo, cabe destacar que la pirrolopirimidina **3.38** portadora de un grupo bencilo en la posición 2, aunque mostró valores de inhibición de la actividad bajos, presentó un valor de CI_{50} en el ensayo de dimerización de 21.97 μ M, similar al de los péptidos prototipo **P2** y **1.01**. Estos datos podrían validar los resultados que se habían obtenido teóricamente en los experimentos de *docking* realizados con la pirrolopirimidina **3.01** comentados anteriormente, que postulaban que la introducción de un grupo bencilo en dicha posición podría rellenar de manera más eficaz el hueco hidrófobo de esta zona de la interfaz de dimerización estableciendo una interacción de π -*stacking* con el residuo de Phe454.

Por tanto, nos encontramos frente a los primeros inhibidores no peptídicos de la dimerización de *Li*-TryR, con un valor de CI_{50} comparable al de los péptidos y peptidomiméticos descritos en esta memoria.

Los ensayos *in vitro* frente a los parásitos de *Leishmania infantum* de los compuestos **3.01**, **3.36-3.38** mostraron valores de $CI_{50} \geq 25 \mu$ M tanto en los ensayos frente a amastigotes y promastigotes, como en monocitos THP-1. Esta falta de actividad leishmanicida podría ser debida a unos valores bajos de inhibición de la TryR, por lo que actualmente nuestros esfuerzos están centrados en optimizar la actividad de los compuestos frente a la inhibición de la TryR.

3.4. Inhibidores no peptídicos obtenidos mediante cribado virtual

Las estrategias de *docking* y cribado virtual juegan un papel cada vez más relevante en el largo proceso de descubrimiento de fármacos desde el trabajo pionero desarrollado por Kuntz y colaboradores a principios de los 80.³¹

La estrategia que seguimos para la búsqueda de inhibidores no peptídicos de la dimerización de *Li*-TryR, fue una estrategia basada en el cribado virtual de quimiotecas para encontrar nuevos inhibidores de dicho proceso, de naturaleza no peptídica.

Así, en base al modelo de farmacóforo definido en el apartado 3.2, se realizó un cribado virtual empleando el programa de cribado virtual CRDOCK³², implementado en

la plataforma VSDMIP³², desarrollada por el Dr. Federico Gago (Universidad de Alcalá) y sus colaboradores³², dentro del proyecto BIPEDD financiado por la Comunidad de Madrid, y en el que participa nuestro grupo junto con los mencionados autores.

Un paso clave en todo cribado virtual es la elección y preparación de las quimiotecas a cribar. En nuestro caso se utilizaron dos quimiotecas distintas: (a) una quimioteca del **NCI**³³ (*National Cancer Institute*) (con más de 200000 compuestos), y (b) la quimioteca de nuestro propio grupo de investigación en el **IQM** (Instituto de Química Médica), que cuenta con más de 2000 moléculas.

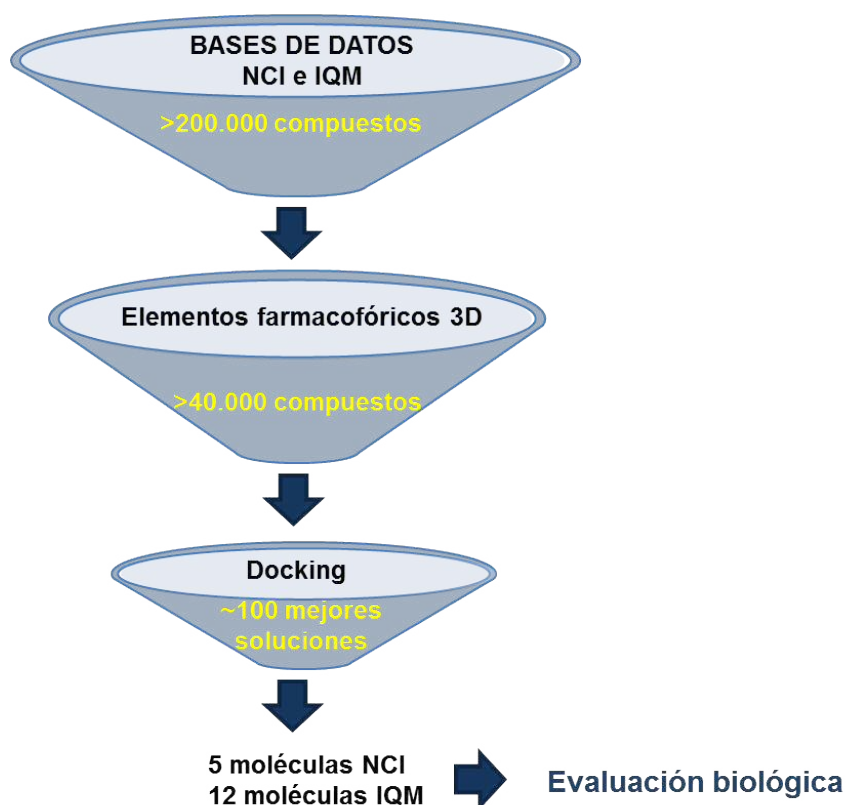
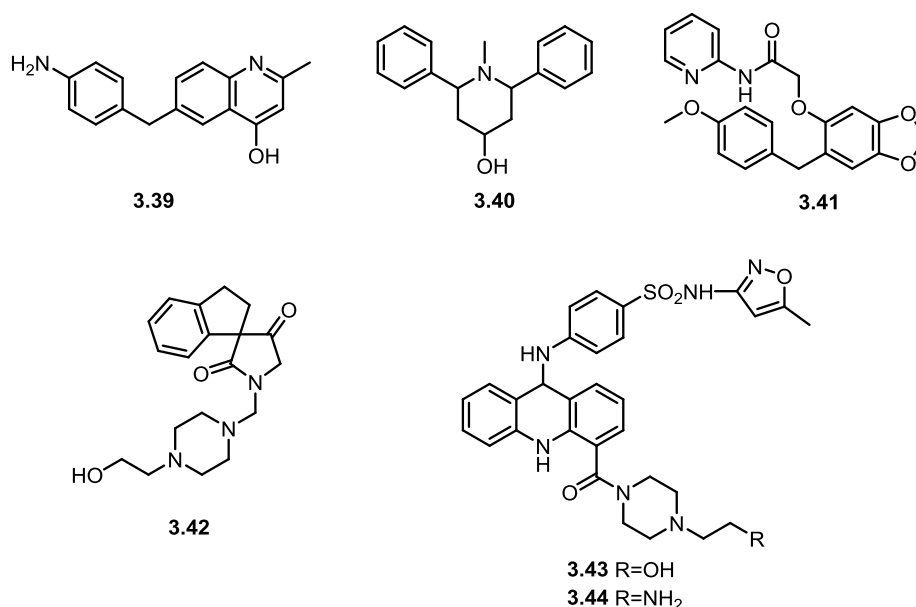


Figura 3.20. Protocolo del cribado virtual (VS) llevado a cabo.

En la Figura 3.20 se muestra de forma esquemática el protocolo seguido en el cribado virtual. Primeramente, se filtraron las quimiotecas con los elementos farmacofóricos 3D descritos. Después, se realizó un *docking* de las estructuras seleccionadas en la interfaz de dimerización de *Li-TryR*. De las moléculas que recibieron una mejor puntuación (*score*) se descartaron las que presentaban un perfil farmacocinético pobre y se sometieron las restantes a inspección visual para juzgar la bondad del ajuste (Figura 3.20). Como resultado final de este proceso se

seleccionaron cinco moléculas pertenecientes a la base de datos del NCI (**3.39-3.43**) (Figura 3.21) y doce de la base de datos del IQM (**3.53-3.64**) (Figura 3.23).

3.4.1. Obtención de los “hits” virtuales de las quimiotecas del NCI y del IQM



Compuesto Docking	Base de datos NCI (ID)	Fórmula molecular	MW (Da)	logP
3.39	109732	C ₁₇ H ₁₆ N ₂ O	264.3262	3.32
3.40	49910	C ₁₈ H ₂₁ NO	267.3654	3.13
3.41	350114	C ₂₂ H ₂₀ N ₂ O ₅	392.4046	4.37
3.42	602700	C ₁₉ H ₂₅ N ₃ O ₃	343.4201	-
3.43	644042	C ₃₀ H ₃₀ N ₆ O ₅ S	585.6614	-

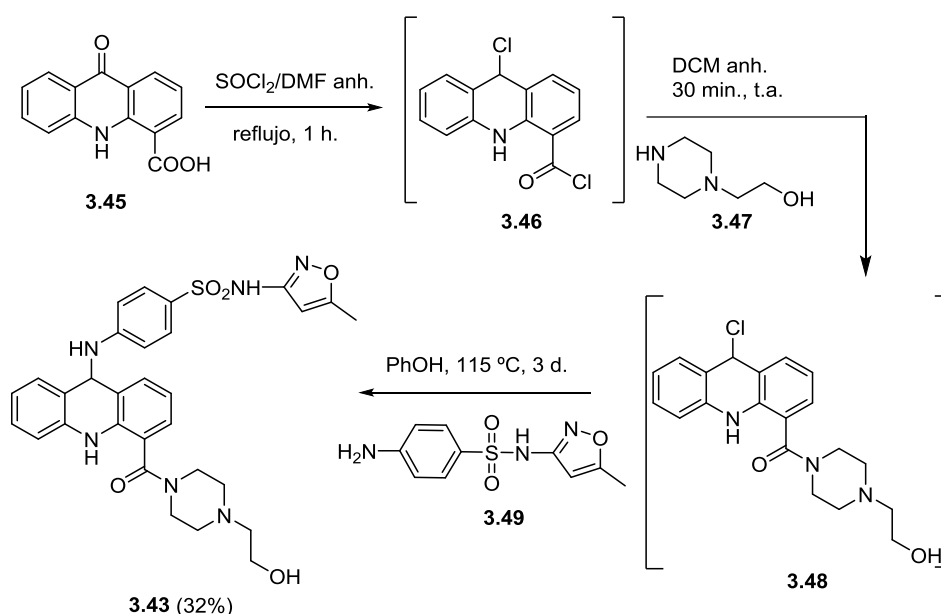
Figura 3.21. Moléculas seleccionadas del cribado virtual de la base de datos del NCI.

En cuanto a las moléculas seleccionadas de la quimioteca del NCI (Figura 3.21), los compuestos **3.39**, **3.40**, **3.41** y **3.42** fueron suministradas por el NCI. El compuesto **3.43** no estaba disponible en el NCI, por lo que fue necesaria su síntesis, que se comentará más adelante. Además, un análisis de los estudios de *docking* de esta molécula en la interfaz de dimerización de *Li*-TryR (Figura 3.22), nos llevó a proponer como análogo de interés el compuesto **3.44** (no descrito hasta el momento) (Figura 3.21). Esta estructura, portadora de un grupo amino en lugar de un hidroxilo, podría favorecer la interacción mediante la formación de un enlace de hidrógeno más efectivo con el residuo de Glu436 de la enzima, situado a menos de 3 Å.



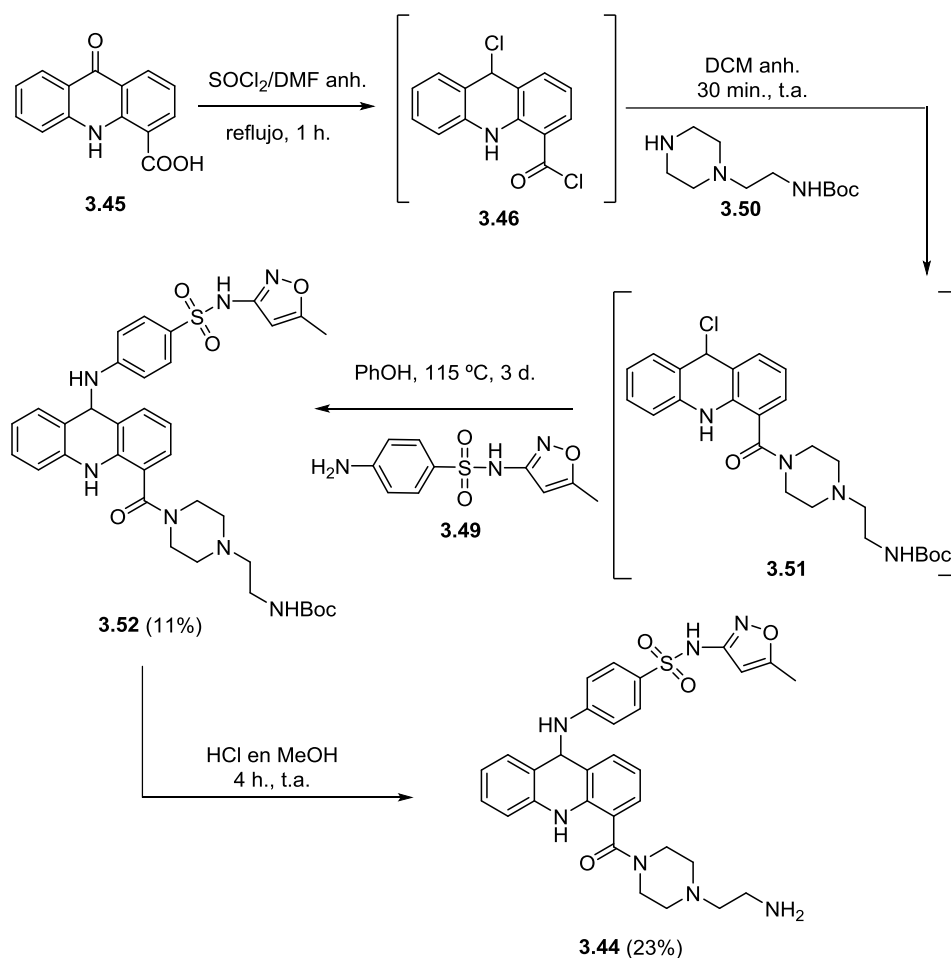
Figura 3.22. Docking de la molécula **3.43** del NCI sobre la interfaz de dimerización de *Li-TryR*.

La síntesis del compuesto **3.43**³⁴ se llevó a cabo siguiendo procedimientos descritos³⁵ según se recoge en el Esquema 3.11. Así, el tratamiento de 4-carboxi-9-acridanona comercial (**3.45**) con cloruro de tionilo seco en DMF anhidra condujo al cloruro de ácido **3.46**, que sin purificación previa se hizo reaccionar con 1-(2-hidroxiethyl)piperazina (**3.47**), para dar lugar a la amida **3.48** (identificada por HPLC-MS). A continuación, el compuesto **3.48** (sin aislamiento previo) se trató con la anilina comercial **3.49**, según las condiciones descritas por Atwell y colaboradores³⁵, dando lugar, tras purificación cromatográfica, al producto deseado **3.43** con un 32% de rendimiento global.



Esquema 3.11. Síntesis del compuesto **3.43** a partir del reactivo comercial **3.45**.

Siguiendo un procedimiento similar se sintetizó **3.44** (Esquema 3.12), utilizando en este caso el derivado comercial de piperazina protegido con el grupo Boc **3.52**, que tras tratamiento con la anilina **3.49** permitió el aislamiento del intermedio **3.52** con un 11% de rendimiento. Finalmente, la desprotección del grupo Boc en medio ácido, en condiciones estándar³⁶ condujo al compuesto **3.44** deseado en un 23% de rendimiento.



Esquema 3.12. Síntesis del compuesto **3.44** a partir del reactivo comercial **3.45**.

Del cribado virtual realizado empleando la quimioteca del **IQM**, una base de datos de compuestos sintetizados en nuestro grupo de investigación y que ha sido ampliada recientemente con ligandos virtuales, se seleccionaron como resultado 12 candidatos. Las estructuras de estos 12 “hits” virtuales se muestran en la Figura 3.23.

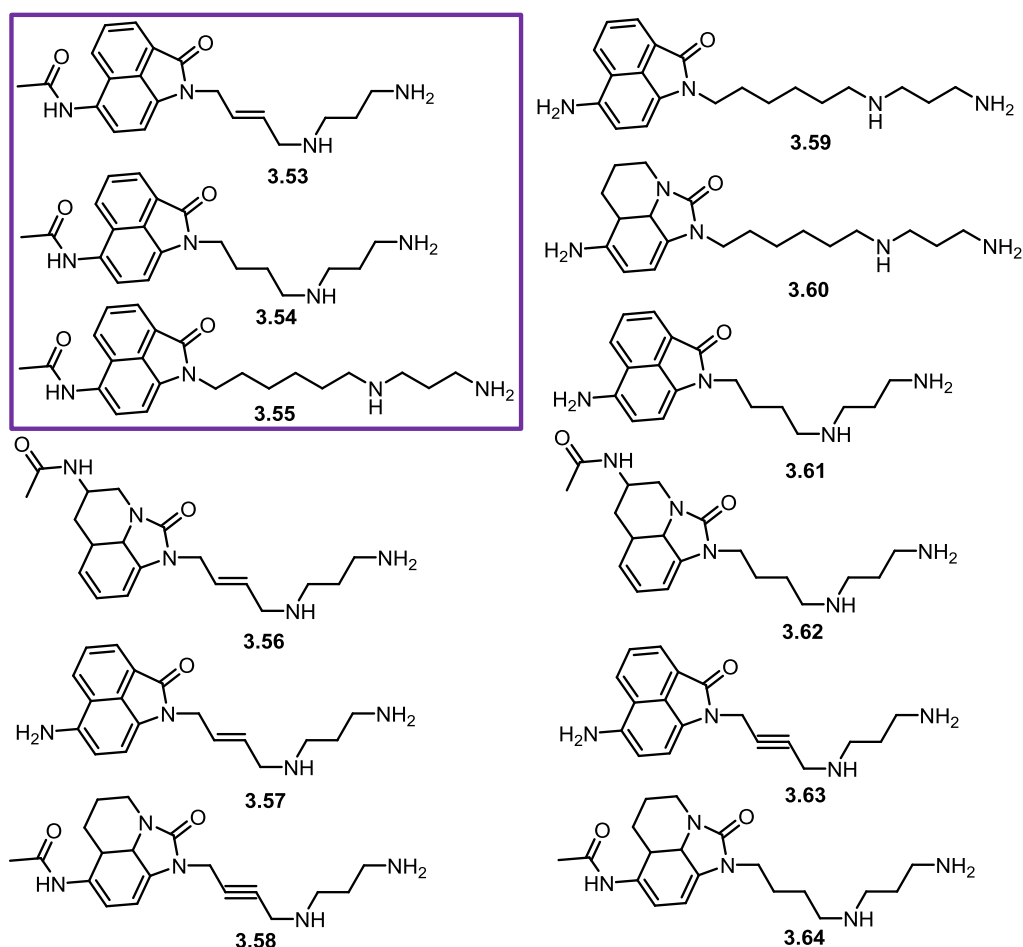


Figura 3.23. Moléculas seleccionadas del cribado virtual de la base de datos del IQM.

Estas moléculas no estaban disponibles en nuestro laboratorio, ya que se trataba de ligandos virtuales. Por facilidad sintética y el buen *score* obtenido en la campaña de cribado se decidió sintetizar los compuestos **3.53**, **3.54** y **3.55** (Figuras 3.23 y 3.24), portadores de un anillo de benz[cd]indol-2-(1H)-ona acetilado en su grupo amino (que aumentaría su estabilidad química) y sustituido en la posición 1 con cadenas polimetilénicas con grupos amino libres que podrían interaccionar con el Glu436. Además, los triciclos aromáticos podrían interaccionar con la Phe454 del hueco hidrófobo de la interfaz mencionado anteriormente (Figura 3.24).

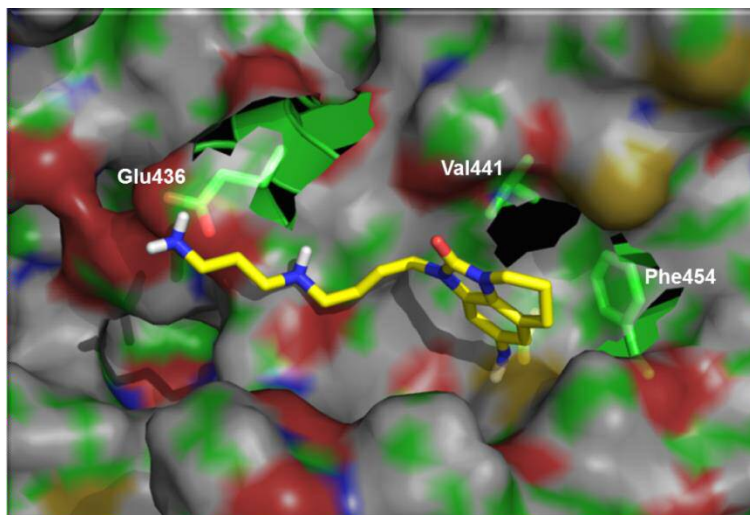
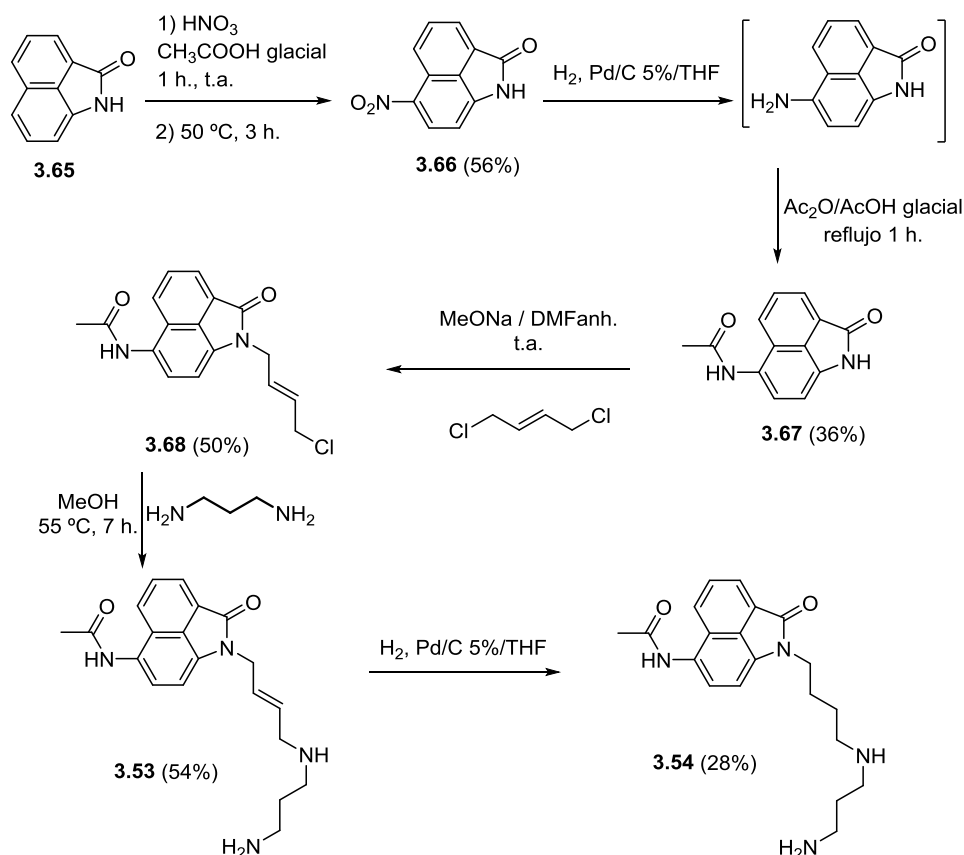


Figura 3.24. Docking de **3.54** en la interfaz de dimerización de *Li-TryR*.

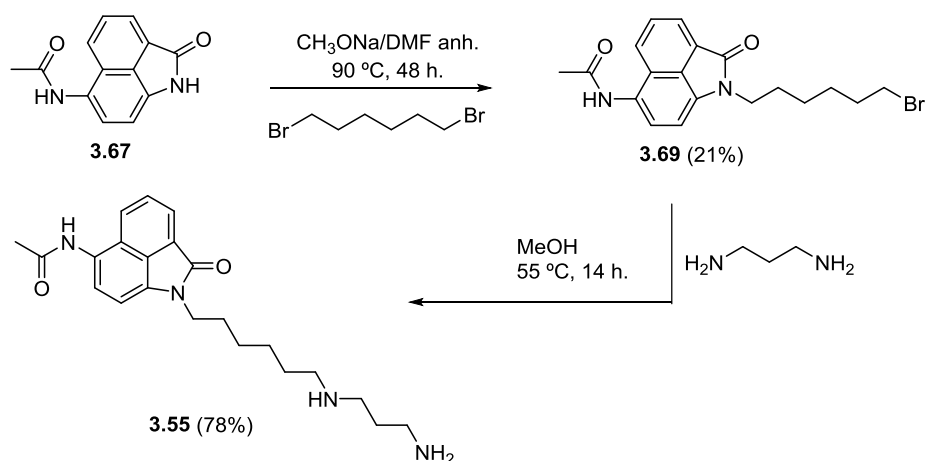
La síntesis de estos “hits” virtuales se detalla en los Esquemas 3.13 y 3.14.



Esquema 3.13. Síntesis de los compuestos **3.53** y **3.54**.

Así, la nitración de la benz[*cd*]indol-2(1H)-ona (**3.65**) por reacción con ácido nítrico y ácido acético glacial condujo al nitro derivado **3.66** con un 56% de rendimiento. La

posterior hidrogenación catalítica ($\text{H}_2/\text{Pd/C}$ al 5%), seguida de la acetilación del grupo amino, dio lugar al intermedio **3.67** con un 36% de rendimiento global.³⁷ La reacción de **3.67** con (*E*)-1,4-dicloro-2-buteno y metóxido sódico condujo al halogenuro intermedio **3.68** (50% de rendimiento). Por último, la reacción de sustitución nucleófila de **3.68** con 1,3-diaminopropano en metanol a 55 °C condujo a **3.53** (54% de rendimiento), que por hidrogenación catalítica rindió **3.54** con un 28% de rendimiento (Esquema 3.13).



Esquema 3.14. Síntesis del compuesto **3.55**.

La síntesis del compuesto **3.55** (Esquema 3.14) se llevó a cabo siguiendo una estrategia similar, por reacción de alquilación del derivado acetilado **3.67** con 1,6-dibromohexano seguida de una reacción de S_N con 1,3-diaminopropano, que condujo a **3.55** con un rendimiento del 78% tras purificación cromatográfica.

3.4.2. Evaluación biológica

Los compuestos seleccionados en el cribado virtual (**3.39-3.44** y **3.53-3.55**) junto con los compuestos sintetizados (**3.52** y **3.66-3.69**) fueron evaluados en ensayos enzimáticos de actividad y de dimerización de la TryR de *L. infantum* por el grupo del Dr. Antonio Jiménez de la Universidad de Alcalá.

3.4.2.1. Inhibición de la actividad enzimática de la *Li*-TryR

Se evaluó la actividad oxidorreductasa de todas las moléculas mencionadas anteriormente siguiendo los procedimientos descritos en el Capítulo 1. Los datos de actividad biológica (Tabla 3.2) mostraron que las moléculas **3.39-3.42** (suministradas

por el NCI) junto con las sintetizadas **3.43**, **3.44** y **3.52** eran inactivas. En el caso de las moléculas seleccionadas en el cribado virtual del IQM, los compuestos **3.66-3.69** fueron inactivos, mientras que **3.53**, **3.54** y **3.55** mostraron una inhibición moderada de la actividad enzimática a nivel micromolar. A pesar de que las moléculas **3.53**, **3.54** y **3.55** fueron menos activas que los péptidos prototipo **P2** y **1.01**, nos encontramos frente a unos nuevos inhibidores de la actividad oxidorreductasa de la TryR de naturaleza no peptídica desarrollados en nuestro grupo y de estructura diferente a la de otros inhibidores de este tipo de actividad descritos en la bibliografía.

Tabla 3.2. Valores de CI_{50} de inhibición de la actividad oxidorreductasa de *L*-TryR de los compuestos seleccionados del cribado virtual e intermedios sintéticos.

	Molécula	CI_{50} act. (μM)*
NCI	3.39	> 200
	3.40	> 200
	3.41	> 200
	3.42	> 200
	3.43	> 200
	3.44	> 200
	3.52	> 200
IQM	3.53	101.36 \pm 27.91
	3.54	48.64 \pm 4.92
	3.55	57.85 \pm 4.84
	3.66	> 200
	3.67	> 200
	3.68	> 200
	3.69	> 200
prototipos	P2	1.84 \pm 0.28
	1.01	1.50 \pm 0.15

* Concentración inhibitoria necesaria para inhibir al 50% la actividad de la enzima.

3.4.2.2. Inhibición del proceso de dimerización de la *Li-TryR*

Por otra parte llevamos a cabo la evaluación de la capacidad de estos compuestos de interferir el proceso de dimerización de la enzima. En el ensayo de dimerización se evaluaron únicamente los compuestos **3.53-3.55**, que habían resultado ser inhibidores de la enzima en los ensayos previos. En estos estudios se pudo observar que todas las moléculas evaluadas interfieren el proceso de dimerización comportándose no como inhibidores, si no como estabilizadores de dicho proceso, dando lugar a un aumento de la proporción de homodímero. En la Figura 3.25 se muestra el porcentaje de homodímero TryR formado en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes del péptido **1.01** (verde) y del compuesto no peptídico **3.54** (naranja). Como puede observarse, mientras que **1.01** es un inhibidor del proceso de dimerización, dando lugar a una menor formación de dímero, en el derivado no peptídico **3.54** se ve un aumento del porcentaje del dímero, especialmente relevante a concentraciones altas del compuesto, al igual que ocurría con los péptidos grapados mencionados en el Capítulo 1.

% Dímero TryR tras incubación durante 24 h con los compuestos en estudio

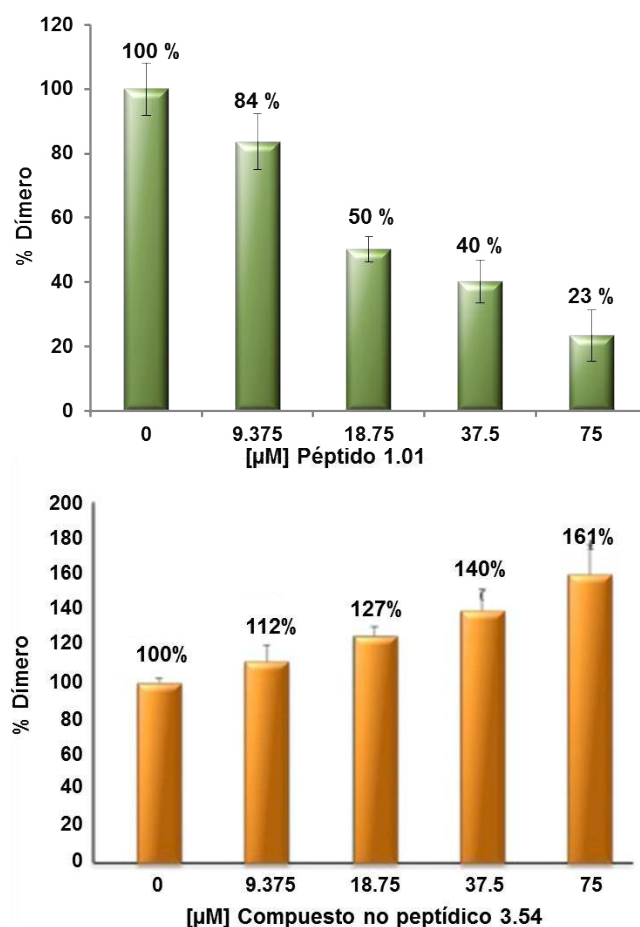


Figura 3.25. Ensayo de dimerización para el péptido **1.01** (verde) y el compuesto **3.54** (naranja).

En la Figura 3.26 se observa de nuevo este efecto para los compuestos **3.53** y **3.55**.

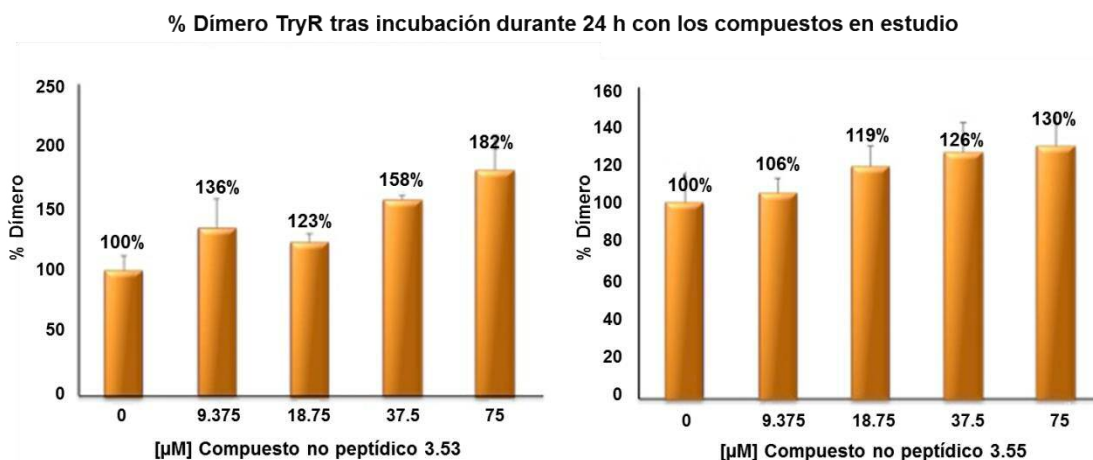


Figura 3.26. Ensayo de dimerización para los compuestos **3.53** y **3.55**.

Finalmente, cabe señalar que en la actualidad se está llevando a cabo la evaluación biológica en cultivos celulares frente a los parásitos de los derivados no peptídicos obtenidos, no disponiendo de estos resultados a fecha de escritura de esta memoria.

3.5. Conclusiones

En este Capítulo se ha llevado a cabo la síntesis de peptidomiméticos de naturaleza no peptídica, con el fin de obtener inhibidores con mejores propiedades farmacocinéticas que los péptidos prototipo sintetizados.

Por un lado, se ha diseñado y sintetizado una pequeña quimioteca de miméticos estructurales de hélices α basados en el esqueleto principal de pirrolopirimidina. En base a estudios teóricos, se determinó la gran relevancia y el carácter hidrófobo de la interfaz de dimerización en el hueco en el que se localiza la cadena lateral de la Ile9 de los péptidos prototipo. Por ello, se sintetizaron diferentes pirrolopirimidinas sustituidas en la posición 2 (residuo mimético de la cadena lateral de la Ile9 de los péptidos) con grupos hidrófobos de diferente tamaño. Los ensayos biológicos mostraron que la pirrolopirimidina **3.38** (portadora de un grupo bencilo en la posición 2) resultó ser un potente inhibidor del proceso de dimerización de la *Li*-TryR con valores de CI_{50} en el rango micromolar, muy similares a los de los péptidos prototipo **P2** y **1.01**.

Por otro lado, mediante el cribado virtual de dos quimiotecas (NCI e IQM) se seleccionaron diversos “hits” cuyos ensayos biológicos mostraron que las moléculas **3.45-3.47** inhiben la actividad oxidoreductasa de la *Li*-TryR de manera moderada (en el rango micromolar). Los ensayos de dimerización de estas moléculas mostraron su comportamiento como estabilizadores del homodímero de *Li*-TryR (hecho que ya había sido visto anteriormente para los péptidos grapados **1.37b** y **1.41b**). Aunque a fecha de hoy desconocemos el significado biológico de este fenómeno de estabilización, los péptidos grapados y los derivados no peptídicos descritos en este trabajo podrían ayudar a comprender y profundizar en el conocimiento de este efecto de estabilización de la enzima. Actualmente, se están utilizando estos estabilizadores como herramientas en los primeros intentos de co-cristalización de estos compuestos con el monómero de *Li*-TryR en colaboración con el grupo del Dr. Juan Hermoso (IQFR-CSIC) que podrían ser de utilidad para conocer el modo de interacción de estos compuestos con la enzima.

Finalmente, cabe destacar, que en este capítulo hemos descrito los primeros inhibidores (**3.38**) y estabilizadores (**3.45-3.47**) del proceso de dimerización de la *Li*-TryR de naturaleza no peptídica. Estas moléculas podrán ser objeto de modificación con el fin de mejorar la inhibición de la actividad y la dimerización frente a *Li*-TryR y evaluar su actividad leishmanicida.

3.6. Bibliografía

1. Toro, M.A.; Sánchez-Murcia, P.A.; Moreno, D.; Ruiz-Santaquiteria, M.; Alzate, J.F.; Negri, A.; Camarasa, M.J.; Gago, F.; Velázquez, S.; Jiménez-Ruiz, A. Probing the Dimerization Interface of *Leishmania infantum* Trypanothione Reductase with Site-Directed Mutagenesis and Short Peptides. *ChemBioChem*, **2013**, *14*, 1212-1217.
2. Sánchez, P. A. Interacciones proteína-proteína como diana terapéutica en la transcriptasa inversa del VIH-1 y en la tripanotión reductasa de *Leishmania infantum*. Tesis Doctoral. **2013**. Universidad Complutense de Madrid.
3. URL: <http://farmamol.uah.es/index.php/en/2-uncategorised/5-cgrill>
4. URL: <http://dogsite.zbh.uni-hamburg.de>
5. URL: <http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/fpocket/>
6. Pelay-Gimeno, M.; Glas, A.; Koch, O.; Grossmann, T. N. Structure-based design of inhibitors of protein-protein interactions: mimicking peptide binding epitopes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 8896-8927.
7. Orner, B. P.; Ernst, J. T.; Hamilton, A. D. Toward proteomimetics: Terphenyl derivatives as structural and functional mimics of extended regions of an α -helix. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5382-5383.
8. Nolan, W. P.; Ratcliffe, G. S.; Rees, D. C. The synthesis of 1,6-disubstituted indanes which mimic the orientation of amino acid side-chains in a protein alpha-helix motif. *Tetr. Lett.* **1992**, *33*, 6879-6882.
9. Horwell, D. C.; Howson, W.; Ratcliffe, G. S.; Willems, H. M. G. The design of dipeptide helical mimetics: The synthesis tachykinin receptor affinity and conformational analysis of 1,1,6-trisubstituted indanes. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 33-42.
10. Azzarito, V.; Long, K.; Murphy, N. S.; Wilson, A. J. Inhibition of α -helix-mediated protein-protein interactions using designed molecules. *Nature Chemistry*, **2013**, *5*, 161-173.
11. Maity, P.; König, B. Synthesis and Structure of 1,4-Dipiperazino Benzenes: Chiral Terphenyl-type Peptide Helix Mimetics. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1473-1476.
12. Moisan, L.; Odermatt, S.; Gombosuren, N.; Carella, A.; Rebek, J. Synthesis of an Oxazole–Pyrrole–Piperazine Scaffold as an α -Helix Mimetic. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008*, 1673-1676.

13. Peters, M.; Trobe, M.; Breinbauer, R. A Modular Synthesis of Teraryl-Based α -Helix Mimetics, Part 2: Synthesis of 5-Pyridine Boronic Acid Pinacol Ester Building Blocks with Amino Acid Side Chains in 3-Position. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 2450-2456.
14. Becerril, J.; Hamilton, A. D. Helix Mimetics as Inhibitors of the Interaction of the Estrogen Receptor with Coactivator Peptides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4471-4473.
15. Lee, J. H.; Lim, H. S. Solid-phase synthesis of tetrasubstituted pyrrolo[2,3-d]pyrimidines. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 4229-4235.
16. Lee, J. H.; Zhang, Q.; Jo, S.; Chai, S. C.; Oh, M.; Im, W.; Lu, H.; Lim, H. S. Novel pyrrolopyrimidine-based α -helix mimetics: cell-permeable inhibitors of protein-protein interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 676-679.
17. Burslem, G. M.; Wilson, A. J. Synthesis of oligobenzamide α -helix mimetics. *Synlett.* **2014**, *25*, 324-335.
18. Plante, J. P.; Burnley, T.; Malkova, B.; Webb, M. E.; Warriner, S. L.; Edwards, T. A.; Wilson, A. J. Oligobenzamide proteomimetic inhibitors of the p53-hDM2 protein-protein interaction. *Chem. Commun.* **2009**, *34*, 5091-5093.
19. Campbell, F.; Plante, J. P.; Edwards, T. A.; Warriner, S. L.; Wilson, A. J. *N*-Alkylated oligoamide α -helical proteomimetics. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2344-2351.
20. Barnard, A.; Miles, J. A.; Burslem, G. M.; Barker, A. M.; Wilson, A. J. Multivalent helix mimetics for PPI-inhibition *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 258-264.
21. Yin, H.; Hamilton, A. D. Terephthalamide derivatives as mimetics of the helical region of Bak peptide target Bcl-xL protein. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1375-1379.
22. Rodríguez, J. M.; Hamilton, A. D. Benzoylurea Oligomers: Synthetic Foldamers That Mimic Extended α Helices. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8614-8617.
23. Thompson, S.; Hamilton, A. D. Amphiphilic α -helix mimetics based on a benzoylurea scaffold. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5780-5782.
24. Tosovská, P.; Arora, P. S. Oligoioxopiperazines as Nonpeptidic α -Helix Mimetics. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1588-1591.

25. Schafmeister, C. E.; Brown, Z. Z.; Gupta, S. Shape-Programmable Macromolecules. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1387-1398.
26. URL: <http://vina.scripps.edu/>
27. Halgren, T. A.; Murphy, R. B.; Friesner, R. A.; Beard, H. S.; Frye, L. L.; Pollard, W. T.; Banks, J. L. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1750-1759.
28. Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Shaw, D. E.; Francis, P.; Shenkin, P. S. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739-1749.
29. Olivos, H. J.; Alluri, P. G.; Reddy, M. M.; Salony, D.; Kodadek, T. Microwave-Assisted Solid-phase synthesis of peptoids. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 4057-4059.
30. Clark, M. P.; George, K. M.; Bookland, R. G.; Chen, J.; Laughlin, S. K.; Thakur, K. D.; Lee, W.; Davis, J. R.; Cabrera, E. J.; Brugel, T. A.; VanRens, J. C.; Laufersweiler, M. J.; Maier, J. A.; Sabat, M. P.; Golebiowski, A.; Easwaran, V.; Webster, M. E.; De, B.; Zhang, G. Development of new pyrrolopyrimidine-based inhibitors of Janus kinase 3 (JAK 3). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1250-1253.
31. Kuntz, I. D.; Blaney, J. M.; Oatley, S. J.; Langridge, R.; Ferrin, T. E. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J. Mol. Biol.* **1982**, *161*, 269-288.
32. Cortés-Cabrera, A.; Klett, J.; Dos Santos, H. G.; Perona, A.; Gil-Redondo, R.; Francis, S. M.; Priego, E. M.; Gago, F.; Morreale, A. CRDOCK: An Ultrafast Multipurpose Protein-Ligand Docking Tool. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 2300-2309.
33. URL: <http://cactus.nci.nih.gov/index.html>
34. Ebeid, M. Y.; Mikhael, A. N.; El-Moghazy Aly, S. M.; Eissa, A. A. H. Synthesis and antitumor activity of some 4-{4-[4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-carbonyl]acridin-9-ylamino}benzenesulfonamide derivatives. *Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ.* **1994**, *32*, 361-368.
35. Atwell, G. J.; Cain, B. F.; Baguley, B. C.; Finlay, G. J.; Denny, W. A. Potential antitumor Agents. 43. Synthesis and biological activity of dibasic Q-Aminoacridine-4-carboxamides, a new class of antitumor agent. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 1481-1485.

36. Yajima, H.; Fujii, N. in 'The Peptides,' eds. Gross, E.; Meienhofer, J. *Academic Press, Inc. New York*. **1983**, 5, 65.
37. Familiar, O.; Munier-Lehmann, H.; Negri, A.; Gago, F.; Douguet, D.; Rigouts, L.; Hernandez, A.; Camarasa, M. J.; Perez-Perez, M. J. Exploring Acyclic Nucleoside Analogues as Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* Thymidylate Kinase. *Chem. Med. Chem.* **2008**, 3, 1083-1093.

CONCLUSIONES GENERALES

4. CONCLUSIONES GENERALES

En la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo el diseño y síntesis de inhibidores de interacciones proteína-proteína de la enzima dimérica tripanotión reductasa de *Leishmania infantum* (Li-TryR). Este trabajo se engloba dentro de una línea de investigación desarrollada en nuestro grupo, encaminada a progresar en una novedosa aproximación consistente en la inhibición del proceso de dimerización de la enzima, como un mecanismo de inhibición alternativo y muy poco explorado. Para ello, se ha seguido una estrategia que ha consistido en el diseño de péptidos y peptidomiméticos que mimetizan la estructura secundaria de un *hot spot* (una hélice α presente en la interfaz de dimerización) previamente identificado en nuestro grupo de investigación.

El objetivo global de esta Tesis ha consistido en la optimización del péptido lineal prototipo **P2** (hit), derivado de la mencionada hélice α . Así, se han preparado diferentes tipos de peptidomiméticos en los que se ha ido reduciendo progresivamente el carácter peptídico.

En el **primer Capítulo** se han sintetizado, manualmente en fase sólida, diferentes series de péptidos lineales (Serie 1), péptidos cíclicos (Serie 2) y foldámeros (Serie 3) que han mejorado tanto la estabilidad química como proteolítica del péptido lineal prototipo **P2** manteniendo la actividad del mismo.

Los resultados más relevantes se pueden resumir en los siguientes puntos:

➤ Dentro de la Serie 1 se han obtenido péptidos lineales químicamente más estables que el prototipo **P2**, portadores de residuos de Nle en lugar de Met en su cadena peptídica. El péptido **1.01** se eligió como nuevo prototipo en base a los buenos resultados tanto de actividad como de dimerización frente a la enzima (rango micromolar bajo). Se ha determinado que 9 residuos (**1.05**) es la longitud mínima necesaria de estos péptidos para preservar la actividad.

➤ En cuanto a la Serie 2, se han obtenido péptidos cíclicos de distinta longitud a través de puentes amida y puentes hidrocarbonados en distintas posiciones de ciclación y entre residuos situados en la cara de no interacción con la enzima. La estrategia de ciclación mediante enlaces amida ha resultado más efectiva que mediante puentes hidrocarbonados para la estructuración de los péptidos en disolución. La longitud así como la posición de ciclación en los péptidos cíclicos con puente amida, han sido importantes para la actividad, habiéndose obtenido los mejores resultados para los péptidos **1.09** y **1.10**, ciclados entre los residuos 3/7 y 4/8,

CONCLUSIONES GENERALES

respectivamente. La naturaleza del puente en los péptidos cíclicos (amida vs C-C) no parece influir significativamente en la actividad oxidoreductasa. Sin embargo, sí mostraron diferencias en el proceso de dimerización, siendo los péptidos amida **1.09** y **1.10** inhibidores de este proceso mientras que los péptidos grapados **1.37b** y **1.41b** fueron estabilizadores (*enhancers*).

➤ Finalmente en lo que respecta a la Serie 3, se ha sintetizado una pequeña quimioteca de foldámeros siguiendo diferentes patrones de sustitución de los β^3 -aminoácidos. En general, no se han observado diferencias significativas en la inhibición tanto de la actividad como de la dimerización entre ellos.

➤ Se han realizado estudios de estabilidad proteolítica frente a la proteinasa K de los péptidos cíclicos más activos, siendo los péptidos amida **1.09** y **1.10**, y los grapados **1.37b** y **1.41b** más estables que el nuevo prototipo **1.01**. En cuanto a los foldámeros se observan diferencias en el tiempo de vida media, dependiendo de la posición del residuo β^3 .

En el segundo Capítulo se ha llevado a cabo la evaluación *in vitro* de la actividad leishmanicida y citotóxica de los péptidos y peptidomiméticos más representativos de cada una de las series descritas en el Capítulo 1, resultando inactivos tanto frente a los parásitos, como frente a monocitos humanos THP-1. Estudios de internalización realizados con análogos fluorescentes de dichos compuestos (**2.01-2.04**), mostraron que éstos no atraviesan las membranas celulares de los parásitos. La conjugación de dichos compuestos con péptidos de penetración celular condujo a compuestos con una actividad leishmanicida potente frente a promastigotes y amastigotes. El conjugado del foldámero con poliargininas **2.10** resultó ser el compuesto más activo y menos tóxico de toda la serie con índices de selectividad similares a los fármacos de referencia utilizados.

En base a un estudio previo de la interfaz de dimerización de *Li*-TryR y a un modelo farmacofórico, en el tercer Capítulo se han diseñado y sintetizado peptidomiméticos de naturaleza no peptídica siguiendo dos estrategias diferentes.

➤ La primera estrategia ha consistido en el diseño de un tipo de mimético de hélices α , basado en el esqueleto de pirrolopirimidina. La pirrolopirimidina **3.38**, sustituida con un grupo bencilo en la posición 2 (residuo mimético de la cadena lateral de la Ile9 de los péptidos) fue un inhibidor potente del proceso de dimerización de la *Li*-TryR.

➤ En la segunda estrategia se seleccionaron y sintetizaron diversos “hits” obtenidos del cribado virtual de dos quimiotecas (NCI e IQM). Se obtuvieron compuestos (**3.45-3.47**) que inhiben la actividad oxidorreductasa de la enzima de manera moderada y que se comportan como estabilizadores del homodímero de *Li-TryR*. Aunque a fecha de hoy desconocemos el significado biológico de este fenómeno de estabilización, los compuestos descritos en esta tesis doctoral podrían ayudar a comprender y profundizar en el conocimiento de este efecto.

PARTE EXPERIMENTAL

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Métodos generales

Los experimentos que involucraron compuestos sensibles al H₂O se realizaron en estrictas condiciones anhidras bajo atmósfera de argón. Los sólidos higroscópicos fueron secados previamente en una pistola de vacío durante 24 h empleando P₂O₅ como agente desecante. El DCM, el CH₃CN y la DMF se secaron refluendolos sobre CaH₂ o con tamiz molecular de 3 ó 4 Å activado previamente en el microondas. El THF se destiló sobre Na y benzofenona.

Las reacciones en fase sólida se sometieron a agitación orbital en un equipo IKA-100 a una velocidad de agitación de 320 rpm.

Los experimentos de irradiación de microondas se realizaron en un reactor de microondas monomodo *Initiator™ Eight (Biotage AB)*.

Las centrifugaciones se llevaron a cabo en una centrífuga termostatzada Universal 320R de Hettich, utilizando tubos Falcon de polipropileno de 50 mL.

La liofilización se realizó disolviendo el producto en una mezcla CH₃CN/H₂O empleando un liofilizador *Telstar 6-80*.

Métodos cromatográficos

El seguimiento de las reacciones en disolución se ha efectuado por cromatografía en capa fina empleando cromatofolios de gel de sílice tipo F₂₅₄ (Merck), de un espesor de capa de 0.2 mm. Los compuestos se visualizaron con luz ultravioleta a 254 y 365 nm, o mediante pulverización con una disolución de H₂SO₄ al 5% en EtOH, de ninhidrina al 2% en EtOH o de ácido fosfomolibdico al 5% en EtOH y calefacción. Este seguimiento también se ha llevado a cabo en algunas ocasiones por HPLC-MS, mediante un cromatógrafo HPLC Waters 12695 conectado a un espectrómetro Waters Micromass ZQ.

Los HPLC analíticos se realizaron en un aparato *Waters 600* o en un aparato *Agilent*. En todos los casos se empleó una columna de fase reversa *Sunfire C18* (4,6 mm x 150 mm, 3,5 µm), un detector de UV de longitud de onda variable (*Waters*) o un diodo array (*Agilent*). La fase móvil empleada y referida como A:B corresponde a mezclas de A: CH₃CN y B: H₂O (0.05% TFA) en modo isocrático o en gradiente. En todos los casos el flujo fue de 1 mL/min y la detección de picos se realizó por UV a

214, 220 y 254 nm. Los gradientes empleados fueron los siguientes: **gradiente 1**, 2% inicial de A, gradiente lineal de 15 min hasta 100% de A (gradiente general para el caso de las estructuras peptídicas); **gradiente 2**, 10% inicial de A, gradiente lineal de 10 min hasta 100% de A; **gradiente 3**, 2% inicial de A, gradiente lineal de 15 minutos hasta 40% de A; **gradiente 4**, 2% inicial de A, gradiente lineal de 10 minutos hasta 30% de A; **gradiente 5**, 2% inicial de A, gradiente lineal de 10 minutos hasta 80% de A; **gradiente 6**, 2% inicial de A, gradiente lineal de 20 minutos hasta 100% de A..

La cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de masas (HPLC/MS) se realizó en un cromatógrafo *Waters* integrado por un módulo de separación 2695, un detector *Photodiode Array* 2996 y un espectrómetro de masas *Micromass ZQ 2000*, utilizando una columna de fase reversa *Waters XBridge C₁₈* (2,1 mm x 100 mm, 3,5 µm). Como fase móvil se emplearon mezclas de A: CH₃CN y B: H₂O (0,1% ácido fórmico). Se utilizaron los siguientes gradientes: **gradiente 1**, 2% inicial de A, gradiente lineal de 15 minutos hasta 95% de A; **gradiente 2**, 10% inicial de A, gradiente lineal de 10 minutos hasta 95% de A; **gradiente 3**, 2% inicial de A, gradiente lineal de 15 minutos hasta 40% de A.

El aislamiento y purificación de los productos en disolución se ha realizado mediante: (a) cromatografía en columna (gel de sílice 60 Merck 230-400 mesh), (b) cromatografía centrífuga circular en capa fina (CCTLC) en un cromatotrón® (gel de sílice 60 PF254 con CaSO₄) empleando placas de 1 y 2 mm de espesor con velocidad de flujo de 4 u 8 mL/min, respectivamente, (c) cromatografía de media presión (HPFC) en un equipo de Biotage® Horizon (d) HPLC analítico en un aparato *Waters 600*, utilizando una columna de fase reversa *Sunfire C18* (4.6 mm x 150 mm, 3.5 µm). Se empleó un detector de UV de longitud de onda variable (*Waters*). La fase móvil empleada y referida como A:B corresponde a las mezclas de A: CH₃CN y B: H₂O (0.05% TFA) en modo isocrático o en gradiente. En todos los casos el flujo fue 1 mL/min y la detección de picos se realizó por UV a 254 nm. El gradiente utilizado fue: 10% inicial de A, gradiente lineal de 10 minutos hasta 100% de A.

Los péptidos y las pirrolopirimidinas sintetizados en fase sólida se han purificado en fase reversa por tres métodos distintos empleando diferentes gradientes utilizando como fase móvil A (CH₃CN) y como fase móvil B (H₂O + 0.05% TFA):

- 1) Cromatografía de media presión (HPFC) en un sistema SP1 o Isolera (*Biotage AB*) usando cartuchos KP-C18-HS 12 g (21 x 55 mm) en un gradiente de 0%

inicial de A, hasta un 100% de A en 30 minutos, si no se indica lo contrario. La velocidad de flujo ha sido de 6 mL/min y la detección se ha realizado a 214 nm. Las muestras se cargaron disueltas en la mínima cantidad de H₂O y en el caso que fuese necesario unas gotas de acetonitrilo.

- 2) Cromatografía de extracción de fase sólida a vacío (*manifold*) en cartuchos C18 Discovery SPE (*Aldrich*) utilizando gradientes lineales variables. La fase estacionaria se equilibró previamente con lavados de 100% A, A:B 50:50 y 100% B. La muestra se cargó disuelta en la mínima cantidad de H₂O.
- 3) HPLC semipreparativo en un aparato *Waters* integrado por una bomba *Delta 600*, un detector de absorbancia dual 2487 y un colector de fracciones *Fraction Colector III*, utilizando una columna ACE 5 C18-300 (250 x 10 mm). La velocidad de flujo ha sido de 6 mL/min utilizando diferentes gradientes y con una detección en continuo a longitudes de onda de 214 y 254 nm. Para la inyección del crudo de reacción, los compuestos se disolvieron en la mínima cantidad de H₂O, CH₃CN, DMSO o mezclas de estos; ya que para llevar a cabo la separación se empleó una metodología tipo *sandwich*.

En todos los casos, las distintas fracciones purificadas se analizaron por HPLC analítico y/o HPLC-MS. Los péptidos finales presentaron una pureza superior al 95% en HPLC analítico, salvo que se indique lo contrario.

Métodos para la determinación estructural

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizaron en el disolvente deuterado indicado en cada caso. Los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN fueron registrados en un espectrómetro Varian *INOVA-300* (a 300 y 75 MHz), *Varian INOVA-400* (a 400 y 100 MHz), *Varian MERCURY-400* (a 400 y 100 MHz), *Varian UNITY-500* (a 500 y 125 MHz) en el Centro de Química Orgánica Manuel Lora Tamayo (CSIC), o en un espectrómetro *Bruker Avance 600* equipado con criosonda TXI (a 600.13 y 150.03 MHz) en el Instituto de Química-Física Rocasolano (CSIC) utilizando TMS o DSS como referencia interna. Se han indicado en cada caso los desplazamientos químicos en la escala δ (ppm), la multiplicidad de las señales (s, singlete; d, doblete; t, triplete; dd, doblete de dobletes; dt, doblete de tripletes; m, multiplete; sa, singlete ancho), el valor de la constante de acoplamiento (Hz) y la asignación estructural. Los espectros monodimensionales de ¹H y ¹³C se obtuvieron en condiciones estándar. En aquellos compuestos cuyos espectros monodimensionales presentaban complejidad, la asignación de las diferentes señales de los espectros de

^1H -RMN se realizó mediante experimentos de correlación homonuclear (^1H , ^1H COSY, ^1H , ^1H TOCSY) y las de ^{13}C -RMN mediante experimentos de correlación heteronuclear ^1H , ^{13}C de tipo HSQC. Los espectros bidimensionales heteronucleares (HSQC y HMBC) utilizan la misma anchura espectral en el dominio de protón (6000 Hz) y en el dominio de carbono (3000 Hz), con un tiempo de espera de 1s. Para el experimento de HSQC se procesan los datos en una matriz de 4098 x 2048 puntos y las condiciones del experimento se optimizaron para una constante de acoplamiento heteronuclear a un enlace de 145 Hz. En el caso del experimento HMBC, los datos se procesaron en una matriz de 4096 x 4096 puntos. Las condiciones del experimento se optimizaron para una constante de acoplamiento a larga distancia de 8 Hz.

Los espectros de masas en modo Electrospray (ESI) se registraron en un espectrómetro *Hewlett-Packard 1100SD* en modos positivo o negativo, utilizando como portador MeOH, CH_3CN o bien mezclas de ambos. Los espectros de masas exactas (HRMS) se realizaron en un equipo Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS equipado con un cromatógrafo de líquidos HP-1200 (Agilent) acoplado a espectrómetro de masas con analizador de masas híbrido Q-TOF 6520. Normalmente un error igual o menor de 5 ppm es suficiente para la determinación de la masa exacta. En estas técnicas los picos $[\text{M}+\text{H}]^+$ y $[\text{M}+\text{Na}]^+$ suelen ser las señales más significativas.

Los espectros de dicroísmo circular se han adquirido en un espectrómetro *Jasco 715* (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC) equipado con una celda *Hellma* de 1 mm de paso óptico.

5.2. Productos comerciales

Acetona- d_6	MERCK
Ácido acético	SCHARLAU
Ácido cítrico	ALDRICH
Ácido {2-[2-(Fmoc-amino)etoxi]etoxi}acético	ALDRICH
Ácido <i>p</i> -toluensulfónico	ALDRICH
Ac_2O	ALDRICH
Benzofenona	ALDRICH
Hidruro cálcico	FLUKA
CDCl_3	MERCK
$[\text{Cl}_2(\text{PCy}_3)(\text{Imes})\text{Ru}=\text{CHPh}]$ (catalizador de Grubbs)	ALDRICH
CuI	ALDRICH

DBU	FLUKA
DIC	FLUKA
4,6-Dicloro-2-(pirrolidin-1-il)pirimidina-5-carbaldehido	FCH group
DIEA	ALDRICH
DMSO- <i>d</i> ₆	MERCK
FITC	ALDRICH
Fmoc-S-Ala(4'-pentenil)-OH	AAPTEC
Fmoc-β ³ -Ala-OH	ANANDCHEM
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	IRIS BIOTECH
Fmoc-β ³ -Ile-OH	ANANDCHEM
Fmoc-β ³ -Nle-OH	ANANDCHEM
Fmoc-β ³ -Pro-OH	ANANDCHEM
Fmoc-β ³ -Ser(^t Bu)-OH	ANANDCHEM
Fmoc-β ³ -Val-OH	ANANDCHEM
Fmoc-Gln(Trt)-OH	NOVABIOCHEM
Fmoc-Glu(OAl)-OH	POLYPEPTIDE
Fmoc-Glu(O-2-PhirPr)-OH	NOVABIOCHEM
Fmoc-Gly-OH	NOVABIOCHEM
Fmoc-Ile-OH	NEOSYSTEM
Fmoc-Lys(Alloc)-OH	NOVABIOCHEM
Fmoc-Lys(Boc)-OH	NEOMPS
Fmoc-Lys(Mmt)-OH	NOVABIOCHEM
Fmoc-Met-OH	MERCK
Fmoc-Nle-OH	FLUOROCHEM
Fmoc-Pro-OH	NEOSYSTEM
Fmoc-Ser(^t Bu)-OH	NEOMPS
Fmoc-Val-OH	FLUOROCHEM
HATU	FLUOROCHEM
HCTU	FLUOROCHEM
HOAt	ALDRICH
HOBt	ALDRICH
Mel	ALDRICH
Na	PANREAC
NaCl	PANREAC
NaHCO ₃	PANREAC
NaI	PANREAC
Na ₂ SO ₄ anhidro	PANREAC
NH ₃	PANREAC
NH ₄ Cl	PANREAC
Pd(C) al 10%	FLUKA
Pd(PPh ₃) ₄	ALDRICH
PhSiH ₃	ALDRICH
Piperidina	ALDRICH
P ₂ O ₅	PANREAC
PPh ₃	ALDRICH
Proteinasa K	ALDRICH

PyAOP	ALDRICH
PyBOP	FLUOROCHEM
Resina Rink Amida HMBA (0.56 mmol/g)	IRIS BIOTECH
Resina Rink Amida HMBA (0.38 mmol/g)	NOVABIOCHEM
TBS	ALDRICH
TEA	ALDRICH
TFA	FLUKA
TIPS	ALDRICH
TFE	ALDRICH

Todos los aminoácidos empleados pertenecen a la serie natural *L*, salvo que se indique lo contrario.

Los péptidos que se recogen a continuación fueron suministrados por la empresa *Peptide Protein Research Ltd.* (Hampshire, Reino Unido).

Ac-PKIIQSVGISNleK-NH₂ (**1.02**)

Ac-PKIIQSVGI-NH₂ (**1.05**)

Otros péptidos se encargaron a la empresa francesa *Genosphere Biotechnologies*.

FITC-PEG-PKIIQSVGISNleK-NH₂ (**2.01**)

FITC-PEG-PK-*ciclo*[(CH₂)₂CONH(CH₂)₄]^{3,7}[GIQSG]GISNleKNle-NH₂ (**2.02**)

Ac-RRRRRRRRRPPKIIQSVGISNleKNle-NH₂ (**2.07**)

Ac-PKIIQSVGISNleKNleRRRRRRRRR-NH₂ (**2.08**)

Ac-RRRRRRRRRPPK-*ciclo*[(CH₂)₂CONH(CH₂)₄]^{3,7}[GIQSG]GISNleKNle-NH₂ (**2.09**)

Ac-(RR-Aib)₃-PK-*ciclo*[(CH₂)₂CONH(CH₂)₄]^{3,7}[GIQSG]GISNleKNle-NH₂ (**2.11**)

Ac-RRRRRRRRR-NH₂ (**2.12**)

Ac-RRRRRRRRRKMGISSMVQPKII-NH₂ (**2.13**)

Ac-GRKKRRQRRRPPQPKIIQSVGISNleKNle-NH₂ (**2.14**)

Ac-GRKKRRQRRRPPQ-NH₂ (**2.15**)

FITC-C₆-PKIIQSVGISNleKNleRRRRRRRRR-NH₂ (**2.16**)

5.3. Protocolos generales de síntesis en fase sólida

La síntesis de los péptidos y de las pirrolopirimidinas descritos en esta memoria se ha llevado a cabo manualmente en fase sólida. Para la preparación de los péptidos se ha utilizado la estrategia Fmoc/^tBu, empleando una resina *MBHA* poliestirénica de

carga 0.56 mmol/g (péptidos lineales y pirrolopirimidinas) ó 0.38 mmol/g (péptidos cíclicos) funcionalizada con el espaciador *Rink* amida. Se han empleado jeringas de polipropileno provistas de filtro poroso de polietileno (*Supelco*) de 20 ó 60 mL, dependiendo de la cantidad de resina de partida. Para realizar los diferentes tratamientos se mantiene la matriz sólida dentro de la jeringa y se añade la cantidad de reactivo/disolvente necesaria para hinchar totalmente el polímero. La mezcla de reacción se ha agitado con una varilla de teflón en los lavados y con agitación orbital durante las reacciones empleando un equipo *Grant-Bio* (POS-300). Tras cada lavado, los excesos de reactivos y subproductos junto al disolvente fueron eliminados mediante un sistema-bloque de síntesis de 20 posiciones conectado a vacío especial para fase sólida (*Promega*).

5.3.1. Seguimiento de las reacciones

Las reacciones se han monitorizado mediante el ensayo colorimétrico de Kaiser o de cloranilo para la detección cualitativa de aminas primarias libres o secundarias, respectivamente. También se han monitorizado mediante análisis por HPLC-MS tras realizar el desanclaje del péptido de una pequeña fracción de peptidil-resina.

- *Ensayo de ninhidrina o de Kaiser*¹

Procedimiento general: A una alícuota de resina seca (3-4 mg) se le añaden 6 gotas del reactivo A y 3 gotas del reactivo B, calentándose la mezcla a 110 °C durante 3 minutos. Una coloración azul o azul-verdosa de la resina o del sobrenadante indica la presencia de aminas primarias (ensayo positivo), mientras que una coloración amarilla indica ausencia de aminas primarias (ensayo negativo).

Reactivo A: Se disuelven 40 mg de fenol en 10 mL de EtOH absoluto en caliente. Por otro lado se prepara una disolución de 65 mg de KCN en 100 mL de H₂O y se diluyen 2 mL de esta disolución en 100 mL de piridina. Seguidamente se mezclan.

Reactivo B: Se disuelve ninhidrina (2.5 g) en EtOH absoluto (50 mL). La disolución se almacena protegida de la luz, preferiblemente bajo atmósfera inerte.

- *Ensayo de cloranilo*²

El ensayo del cloranilo cualitativo se utiliza para evaluar la extensión de los acoplamientos peptídicos sobre aminas secundarias. El procedimiento consiste en preparar una disolución saturada de cloranilo (2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona) en

tolueno (750 mg en 25 mL). A una alícuota de resina lavada y seca se adicionan 5 gotas de la disolución de cloranilo y 15 gotas de acetona, agitándose la mezcla a temperatura ambiente durante 5 minutos. Una coloración azul-verdosa de la resina indica la existencia de aminas secundarias libres (ensayo positivo), mientras que una coloración amarilla indica la ausencia de éstas (ensayo negativo).

- *Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de masas (HPLC-MS)*

La monitorización cuantitativa se ha llevado a cabo mediante análisis por HPLC-MS. Para ello, se trata una pequeña porción de peptidil-resina (5-10 mg) con una disolución ácida de desanclaje (composición dependiente de la naturaleza del péptido) durante al menos 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se recoge el filtrado así como los posteriores lavados con DCM, se concentra a presión reducida y se disuelve el crudo final en CH₃CN, H₂O y/o MeOH (hasta 1.5 mL) para ser analizado por HPLC-MS.

5.3.2. Elongación de la cadena peptídica

En una jeringa con filtro se hincha la resina *MBHA* de tipo amida *Rink* (4 x 0.5 min cada vez, DCM/DMF/DCM/DMF) antes de cada reacción. A continuación, se elimina el grupo protector temporal Fmoc añadiendo 3 volúmenes de una disolución al 20% de piperidina en DMF en volumen (1 x 1 min y 3 x 10 min). La resina se lava cuatro veces con cada disolvente a vacío (4 x 0.5 min cada vez, DMF/DCM/DMF/DCM). Seguidamente, se vuelve a hinchar la resina y se añaden, disueltos en la mínima cantidad de DMF, 1.2 equivalentes de Fmoc-AA-OH, 1.2 equivalentes de HCTU y 2.4 equivalentes de DIEA (3 x 10min). La reacción de acoplamiento se realiza en microondas³ (3 x 10 min) a 40 °C y a 300 rpm. Por último, se lava a vacío con cada disolvente y se deja secar a vacío durante 10 minutos aproximadamente.

5.3.3. Acetilación de las aminas del extremo N-terminal

En la síntesis en fase sólida de péptidos es común acetilar los grupos aminos libres una vez finalizada la síntesis. Para ello, sobre la peptidil-resina hinchada con el extremo N-terminal libre se adicionan tres volúmenes de una mezcla de Ac₂O:DIEA:DMF (1:1:1) (1 x 1 min y 4 x 10 min). Posteriormente, se lava la resina a vacío.

5.3.4. Eliminación de los grupos protectores aliloxycarbonilo (Alloc) y alilo (OAI)

Sobre la peptidil-resina hinchada en DCM seco, se añade una disolución de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.25 eq.) y PhSiH_3 (24 eq.) disueltos en la mínima cantidad de DCM⁴. Se cierra el sistema, se purga con argón y se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. Pasado este tiempo se lava un par de veces con DCM seco y se repite de nuevo la reacción durante otra hora más. La resina se lava a vacío y se elimina el paladio mediante lavado con DCM/DMF/ $\text{Et}_2\text{NCS}_2\text{Na}$ 0.2 M en DMF/DMF/DMC.

5.3.5. Eliminación de los grupos protectores fenilisopropilo (PhiPr) y monometoxitritilo (Mmt)

La desprotección de estas cadenas laterales se realiza empleando una mezcla de TFA:TIPS:DCM 1:2:97. El tiempo de reacción es de 30 minutos y se repite este ciclo dos veces.

5.3.6. Desanclaje de la resina y sedimentación de los péptidos

Sobre la peptidil-resina seca en una jeringa de polipropileno se añade una mezcla de desanclaje formada por TFA:TIPS:H₂O en proporciones 95:2.5:2.5 en volumen. Se cierra la jeringa y se agita sobre agitador orbitálico a temperatura ambiente durante 4 horas. La fase soluble se añade sobre Et₂O frío en dos tubos Falcon de 50 mL. Se lava la resina con TFA y DCM un par de veces y se precipitan cantidades adicionales de péptido sobre el Et₂O frío. Se centrifuga a 5000 rpm durante 10 minutos 3 veces, se elimina el sobrenadante por decantación y se añade Et₂O nuevo cada vez. El sólido obtenido se disuelve en CH₃CN:H₂O y se liofiliza para obtener el crudo final.

5.3.7. Purificación de los péptidos

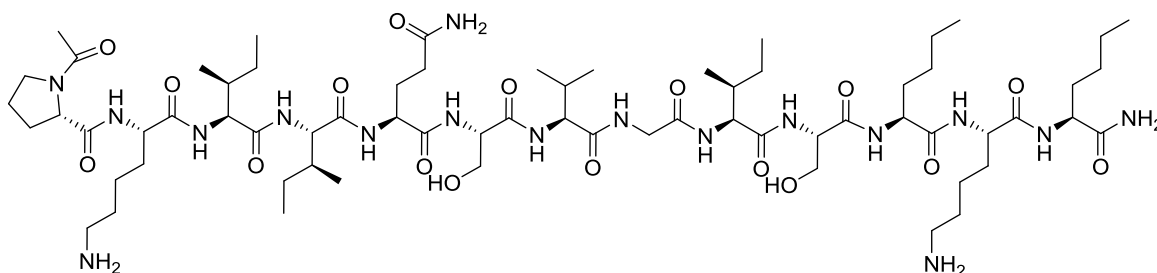
Los péptidos sintetizados se purifican mediante cromatografía en fase reversa empleando diferentes gradientes de H₂O y CH₃CN utilizando los tres procedimientos cromatográficos detallados en el apartado 4.1 de métodos generales: Biotage®, *manifold* o HPLC semipreparativo. En todos los casos, la pureza de los productos finales se determina mediante HPLC analítico. El tiempo de retención así como el gradiente utilizado en cada caso se especifica en la caracterización de cada uno de los péptidos sintetizados.

5.4. Síntesis y caracterización de los péptidos lineales, péptidos cíclicos y foldámeros

5.4.1. Síntesis de los péptidos lineales (Serie 1) (1.01, 1.03, 1.04, 1.06)

Procedimiento general: la síntesis de los péptidos lineales se lleva a cabo a partir de 0.28 mmol de soporte polimérico (carga 0.56 mmol/g) siguiendo el protocolo general de elongación (apartado 4.3.2) usando como aminoácidos Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Lys(^tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ser(O^tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Gly-OH y Fmoc-Nle-OH según corresponda en cada caso, para obtener finalmente los péptidos protegidos en su forma Fmoc anclados a la resina. Posteriormente se lleva a cabo la acetilación del extremo *N*-terminal (apartado 4.3.3) y el desanclaje del péptido de la resina según el protocolo general (apartado 4.3.6). El crudo final se purifica por cromatografía de media presión (HPFC) en fase reversa en el Biotage® (0% inicial de A hasta 100% final de A).

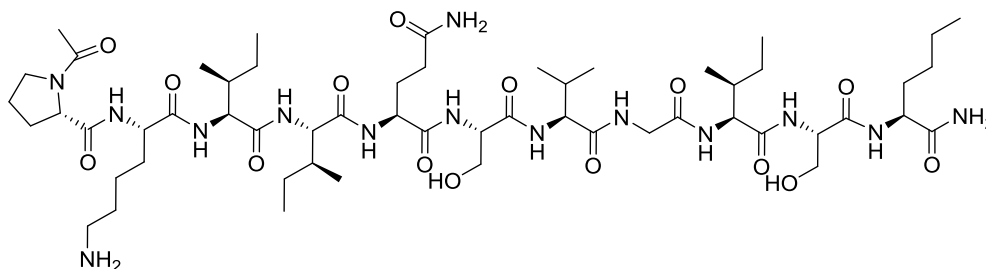
- **Ac-Pro-Lys-Ile-Ile-Gln-Ser-Val-Gly-Ile-Ser-Nle-Lys-Nle-NH₂ (1.01)**



Siguiendo el procedimiento general, a partir de 0.28 mmol de resina se sintetiza el péptido anclado a la resina en su forma Fmoc (peptidil-resina **1.07**) utilizando HCTU como agente de acoplamiento y DIEA como base. Tras eliminar el grupo Fmoc del extremo *N*-terminal, acetilar (**1.08**) y desanclar el péptido de la resina poliestirénica, y purificar se obtuvieron 77 mg (20% rendimiento global) de un sólido algodonoso de color blanco que se identifica como **1.01**.

HPLC-analítico (gradiente 1): t_R = 12.58 min. (90% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para C₆₇H₁₂₁N₁₇O₁₇ 1435.9186; encontrada 1435.9126 (-4.15 ppm).

• **Ac-Pro-Lys-Ile-Ile-Gln-Ser-Val-Gly-Ile-Ser-Nle-NH₂ (1.03)**



Seguindo el procedimiento general, partiendo de 0.28 mmol de resina se lleva a cabo la elongación del péptido. Tras purificar se obtuvieron 118 mg (35% rendimiento global) de un sólido algodonoso de color blanco, que se identificó como **1.03**.

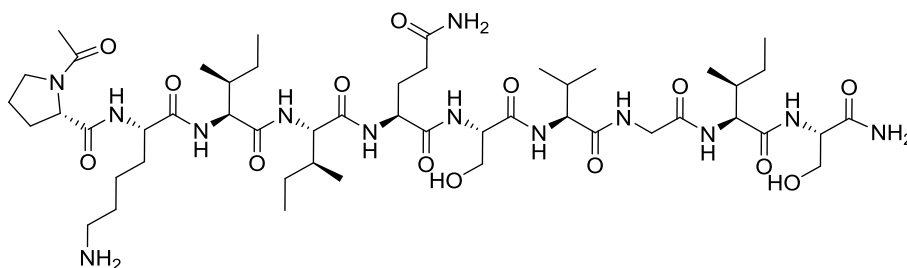
HPLC-analítico (gradiente 1): t_R = 8.44 min. (93% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para C₅₅H₉₈N₁₄O₁₅ 1194.7369; encontrada 1194.7336 (-2.79 ppm).

Tabla 4.1. Desplazamientos químicos de ¹H- y de ¹³C-RMN (ppm)* del péptido **1.03**.

Residuo	NH	¹³ C _α	C _α H	¹³ C _β	C _β H	Otros
CH ₃ CO		22.1	1.97			
Pro1	-	58.8	4.28	nd**	2.04***	C _γ H ₂ 1.80, 1.87; ¹³ C _γ nd** C _δ H ₂ 3.47, 3.52; ¹³ C _δ 47.4
Lys2	8.05	51.8	4.24	26.2	1.50***	C _γ H ₂ 1.32***, ¹³ C _γ nd** C _δ H ₂ 1.67***, ¹³ C _δ 31.0 C _ε H ₂ 2.75***, ¹³ C _ε 38.5 ζ-NH ₃ ⁺ 7.61
Ile3	7.85	52.1	4.14	36.9	1.69	CH ₃ 0.80; ¹³ CH ₃ nd** C _γ H ₃ nd**, ¹³ C _γ H ₃ nd** C _γ H ₂ 1.07; ¹³ C _γ H ₂ nd**
Ile4	7.89	56.5	4.17	36.2	1.71	C _δ H ₃ 0.80; ¹³ C _δ H ₃ nd** C _γ H ₃ nd**, ¹³ C _γ H ₃ nd** C _γ H ₂ 1.07, 1.40; ¹³ C _γ H ₂ nd**
Gln5	8.01	51.9	4.28	27.8	1.73, 1.84	C _γ H ₂ 2.08; ¹³ C _γ 31.1 CONH ₂ nd**
Ser6	7.91	60.0	4.37	nd**	3.52, 3.59	HO- 4.97
Val7	7.76	57.4	4.19	30.2	1.99	C _γ H ₃ 0.85***, ¹³ C _γ 17.6, 18.9
Gly8	8.19	41.5	3.71, 3.77			
Ile9	7.80	56.3	4.27	36.9	1.68	C _δ H ₃ 0.81; ¹³ C _δ 14.3 C _γ H ₃ nd**, ¹³ C _γ nd** C _γ H ₂ 1.04, 1.40; ¹³ C _γ nd**
Ser10	8.08	54.5	4.32	61.4	3.54, 3.57	HO- 5.05
Nle11	7.84	-	4.14	36.9	1.68***	C _γ H ₂ 1.50***, ¹³ C _γ 31.0 C _δ H ₂ 1.24***, ¹³ C _δ 21.6 C _ε H ₂ 0.83***, ¹³ C _ε 13.6 CONH ₂ terminal

*Los espectros de ¹H- y ¹³C-RMN se han adquirido en DMSO-d₆ a 25 °C en un equipo Varian Unity 500 MHz. La adquisición se ha realizado hasta 65 ppm. **nd: no determinado. ***Las señales de los dos protones geminales sobre el mismo carbono no son discernibles entre sí.

• **Ac-Pro-Lys-Ile-Ile-Gln-Ser-Val-Gly-Ile-Ser-NH₂ (1.04)**



Siguiendo el procedimiento general, y a partir de 0.28 mmol de resina, tras

purificación del crudo, liofilización y secado se obtuvieron 119 mg (39% rendimiento global) de un sólido algodonoso blanco, que se identificó como **1.04**.

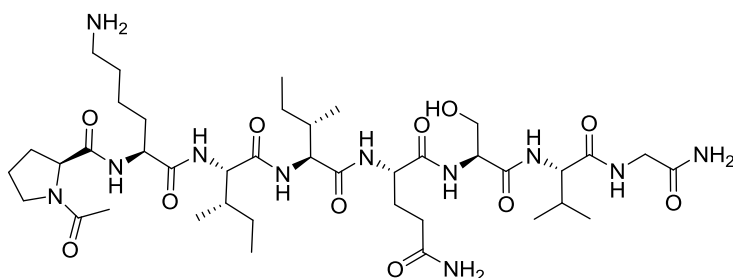
HPLC-analítico (gradiente 1): $t_R = 7.26$ min. (>92% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para C₄₉H₈₇N₁₃O₁₄ 1081.6538; encontrada 1081.6495 (-3.96 ppm).

Tabla 4.2. Desplazamientos químicos de ¹H- y de ¹³C-RMN (ppm)* del péptido **1.04**.

Residuo	NH	¹³ C _α	C _α H	¹³ C _β	C _β H	Otros
CH ₃ CO	-	22.8	1.96			
Pro1	-	52.5	4.27	nd**	2.06	C _γ H ₂ 1.72, 1.83; ¹³ C _γ C _δ H ₂ 3.51***, ¹³ C _δ
Lys2	7.60		4.14	27.0	1.49***	C _γ H ₂ 1.29***, ¹³ C _γ nd** C _δ H ₂ 1.63***, ¹³ C _δ 28.3 C _ε H ₂ 2.74***, ¹³ C _ε 42.4 ζ-NH ₃ ⁺ 7.59
Ile3	7.83		4.35		1.70	CH ₃ 0.78; ¹³ CH ₃ nd** C _γ H ₃ 1.05; ¹³ C _γ H ₃ nd** C _γ H ₂ 1.39***, ¹³ C _γ H ₂ nd**
Ile4	8.03	55.5	4.22		1.69	C _δ H ₃ 0.81; ¹³ C _δ H ₃ 13.6 C _γ H ₃ 1.05; ¹³ C _γ H ₃ nd** C _γ H ₂ 1.30, 1.49; ¹³ C _γ H ₂ nd**
Gln5	8.00	52.5	4.26	29.9	1.72, 1.83	C _γ H ₂ 2.07; ¹³ C _γ H ₂ 30.9 CONH ₂ nd**
Ser6	7.88	58.1	4.19	48.1	3.41, 3.54	HO- 4.84
Val7	7.66	nd**	4.16		1.70	C _{β1} H ₃ 1.38; ¹³ C _{β1} nd** C _γ H ₃ 0.78, 1.04; ¹³ C _γ nd**
Gly8	8.19	42.4	3.71	-	-	-
Ile9	7.75		4.18			C _δ H ₃ 0.83; ¹³ C _δ H ₃ 15.7 C _γ H ₃ nd**, ¹³ C _γ H ₃ nd** C _γ H ₂ 1.98***, ¹³ C _γ H ₂ nd**
Ser10	7.90	55.2	4.35	62.1	3.57, 3.50	HO- 4.96

*Los espectros de ¹H- y ¹³C-RMN se han adquirido en DMSO-d₆ a 25 °C en un equipo Varian Unity 500 MHz. La adquisición se ha realizado hasta 65 ppm. **nd: no determinado. ***Las señales de los dos protones geminales sobre el mismo carbono no son discernibles entre sí.

• **Ac-Pro-Lys-Ile-Ile-Gln-Ser-Val-Gly-NH₂ (1.06)**



Según el procedimiento general, a partir de 0.28 mmol de resina se obtuvieron 108.06 mg (44% rendimiento global) de un sólido blanco algodonoso, que se identificó como **1.06**.

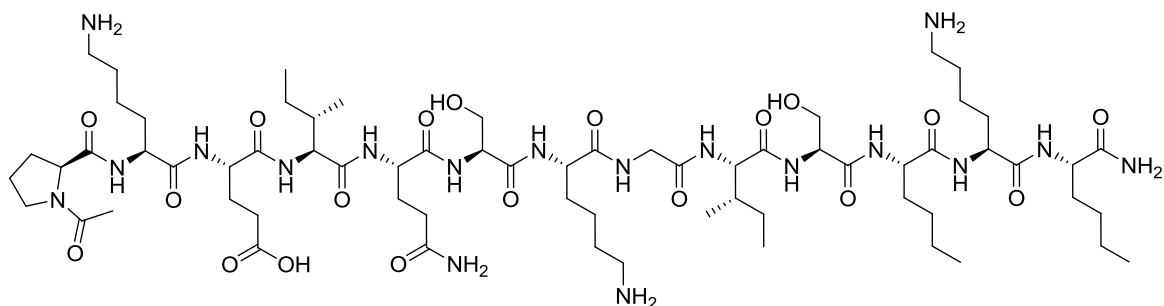
HPLC-analítico (gradiente 1): t_R = 6.95 min. (>93% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para C₄₀H₇₁N₁₁O₁₁ 881.5345; encontrada 881.5335 (1.16 ppm).

5.4.2. Síntesis de los péptidos cíclicos y de sus precursores lineales (Serie 2)

Péptidos cíclicos con puente amida (1.09-1.14) y sus precursores lineales (1.15-1.20)

Procedimiento general: a partir de 0.025-0.342 mmol de resina poliestirénica MBHA de tipo amida *Rink* (carga 0.38 mmol/g) se realiza la elongación de los péptidos, siguiendo el protocolo general descrito, hasta obtener los péptidos acetilados en el extremo *N*-terminal (peptidil-resinas **1.21**, **1.23**, **1.25**, **1.27** y **1.29**). A continuación se desprotegen las cadenas laterales de Glu y Lys siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.3.4, obteniéndose los intermedios **1.22**, **1.24**, **1.26**, **1.28** y **1.30**. Seguidamente se divide la resina en dos partes y sobre una de ellas se realiza el desanclaje del péptido según se indica en el apartado 4.3.6. La purificación del crudo de reacción mediante cromatografía de media presión (HPFC) en fase reversa en el Biotage® (0% inicial de CH₃CN hasta 100% final de CH₃CN) conduce a los análogos lineales **1.15-1.20**. En paralelo, con la segunda porción de resina se lleva a cabo la formación del enlace amida para la obtención de los péptidos cíclicos **1.09-1.14**. Para la ciclación se emplea PyBOP como agente de acoplamiento (3 eq.) y DIEA (6 eq.) como base en NMP (3 volúmenes respecto a la resina). La mezcla se agita durante una hora a temperatura ambiente empleando agitación orbital⁵. Pasado este tiempo se lava la resina a vacío y se deja secar durante unos minutos. Finalmente, se realiza el desanclaje de la resina según el protocolo general descrito (apartado 4.3.6). El crudo final de los péptidos cíclicos se purifica mediante HPLC semipreparativo en fase reversa.

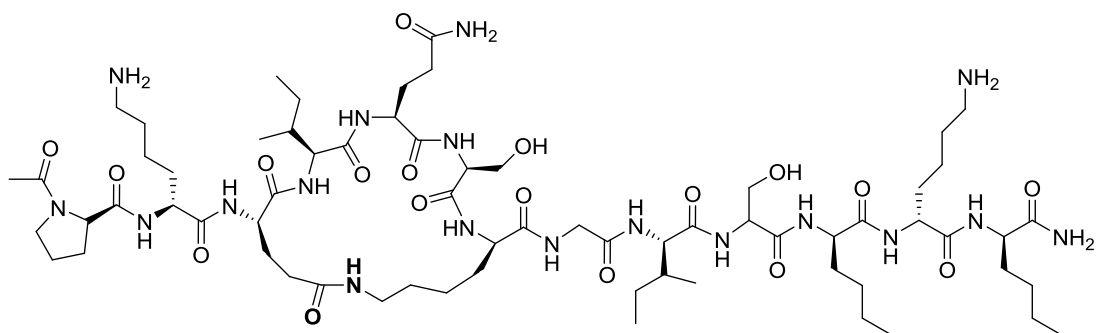
• **Ac-Pro-Lys-Glu-Ile-Gln-Ser-Lys-Gly-Ile-Ser-Nle-Lys-Nle-NH₂ (1.15)**



Seguendo el método general, a partir de 0.076 mmol de resina se obtuvieron 6.73 mg (6% rendimiento global) de un sólido algodonoso blanco, que se identificó como **1.15**, tras purificación.

HPLC-analítico (gradiente 1): $t_R = 7.01$ min. (>97% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para C₆₇H₁₂₀N₁₈O₁₉ 1480.8986; encontrada 1480.8977 (0.62 ppm).

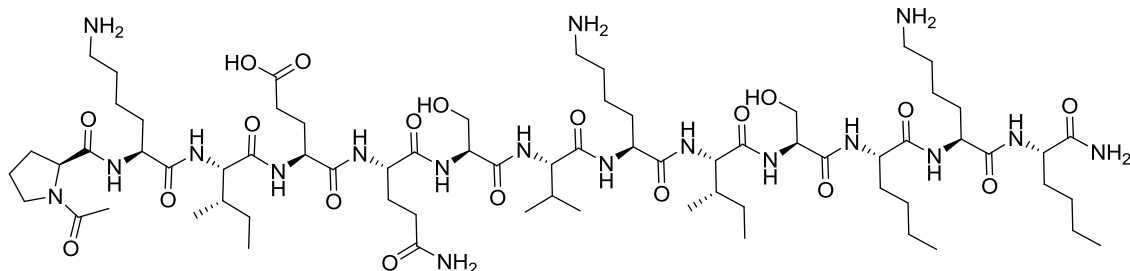
• **Ac-Pro-Lys-ciclo[(CH₂)₂CONH(CH₂)₄]^{3,7}[Gly-Ile-Gln-Ser-Gly]Gly-Ile-Ser-Nle-Lys-Nle-NH₂ (1.09)**



Se partió de 0.025 mmol de resina *MBHA* de tipo amida *Rink* y se sintetizó el péptido anclado a la resina según el protocolo general descrito, acetilado en el extremo *N*-terminal (**1.21**). Después de desproteger las cadenas laterales de Glu y Lys (peptidil-resina **1.22**), se realizó la ciclación con PyBOP/DIEA/NMP, según el protocolo general de ciclación mediante puente amida descrito anteriormente. El péptido cíclico sintetizado se desancló de la resina y el crudo se purificó por HPLC semipreparativo. Tras liofilizar y secar se obtuvieron 3.71 mg (12% de rendimiento global) de un sólido algodonoso blanco, que se identificó como **1.09**.

HPLC-analítico (gradiente 1): $t_R = 6.64$ min. (>95% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para C₆₇H₁₁₈N₁₈O₁₈ 1462.8934; encontrada 1462.8871 (-4.28 ppm).

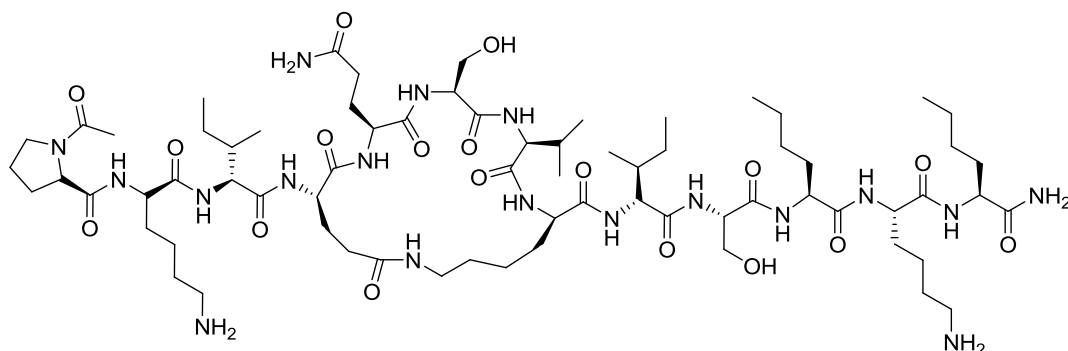
• **Ac-Pro-Lys-Ile-Glu-Gln-Ser-Val-Lys-Ile-Ser-Nle-Lys-Nle-NH₂ (1.16)**



Seguindo el procedimiento general, a partir de 0.076 mmol de resina se obtuvieron 24.62 mg (21% rendimiento global) de un sólido algodonoso blanco, que se identificó como **1.16**.

HPLC-analítico (gradiente 1): t_R = 7.43 min. (>99% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para C₇₀H₁₂₆N₁₈O₁₉ 1506.9461; encontrada 1506.9497 (-2.44 ppm).

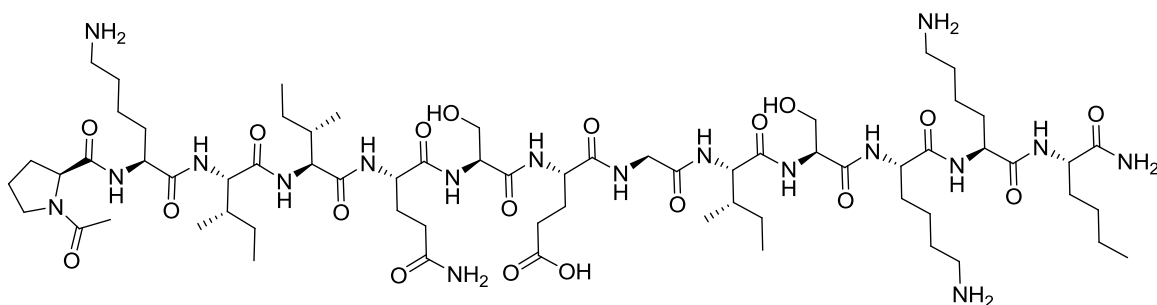
• **Ac-Pro-Lys-Ile-ciclo[(CH₂)₂CONH(CH₂)₄]^{4,8}[Gly-Gln-Ser-Val-Gly]Ile-Ser-Nle-Lys-Nle-NH₂ (1.10)**



A partir de 0.114 mmol de resina, siguiendo el protocolo general de ciclación, se obtuvieron 22.99 mg (13% de rendimiento global) de un sólido algodonoso blanco, que se identificó como el péptido cíclico **1.10**.

HPLC-analítico (gradiente 1): t_R = 8.79 min. (>99% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para C₇₀H₁₂₄N₁₈O₁₈ 1504.9352; encontrada 1504.9341 (0.72 ppm).

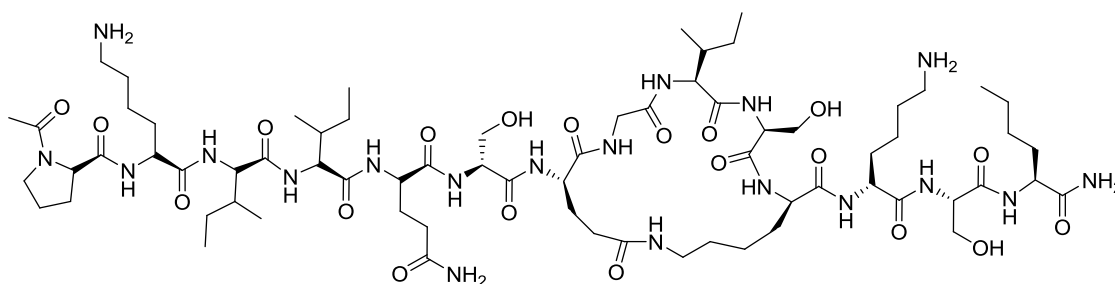
• **Ac-Pro-Lys-Ile-Ile-Gln-Ser-Glu-Gly-Ile-Ser-Lys-Lys-Nle-NH₂ (1.17)**



Partiendo de 0.095 mmol de resina y Fmoc-Glu-(O-2-PhiPr)-OH y Fmoc-Lys(Mmt)-OH, según los protocolos generales descritos anteriormente, y tras la eliminación de los grupos protectores PhiPr y Mmt, que se realizó al mismo tiempo que el desanclaje de la resina, se obtuvieron, tras purificación, 11.93 mg (8% rendimiento global) de un sólido blanco algodonoso, que se identificó como **1.17**.

HPLC-analítico (gradiente 1): t_R = 5.57 min. (>98% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para $C_{67}H_{120}N_{18}O_{19}$ 1480.8980; encontrada 1480.8977 (0.18 ppm).

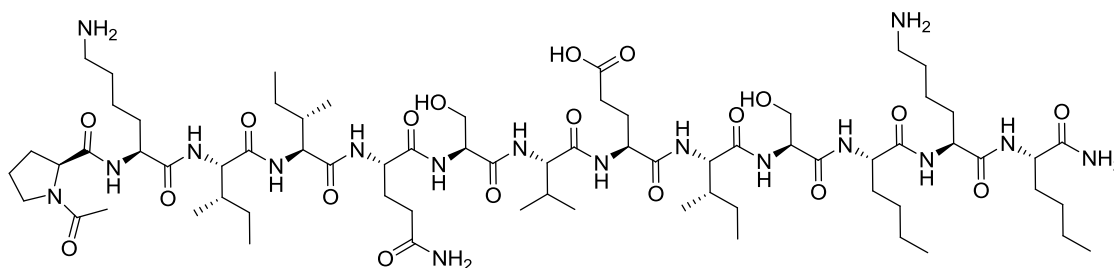
- **Ac-Pro-Lys-Ile-Ile-Gln-Ser-ciclo[(CH₂)₂CONH(CH₂)₄]^{7,11}[Gly-Gly-Ile-Ser-Gly]Lys-Nle-NH₂ (1.11)**



Partiendo de 0.095 mmol de resina se realizó la síntesis empleando Fmoc-Glu-(O-2-PhiPr)-OH y Fmoc-Lys(Mmt)-OH, según los protocolos generales descritos anteriormente (peptidil-resina **1.31**). Una vez introducido el Fmoc-Glu-(O-2-PhiPr)-OH se realizó la desprotección selectiva de las cadenas laterales de Lys y Glu (peptidil-resina **1.32**) según el protocolo descrito en el apartado 4.3.5. La ciclación de las cadenas laterales se llevó a cabo siguiendo el procedimiento general (peptidil-resina **1.33**) y a continuación se terminó la elongación de la cadena peptídica. Después de acetilar siguiendo los protocolos descritos en el apartado 4.3.3 se realizó el desanclaje del péptido de la resina pooliestirénica. Tras purificar el crudo final de reacción, liofilizar y secar se obtuvieron 25.38 mg (18% rendimiento global) de un sólido algodonoso blanco, que se identificó como **1.11**.

HPLC-analítico (gradiente 1): t_R = 7.30 min. (>99% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para $C_{67}H_{118}N_{18}O_{18}$ 1462.8880; encontrada 1462.8871 (0.61 ppm).

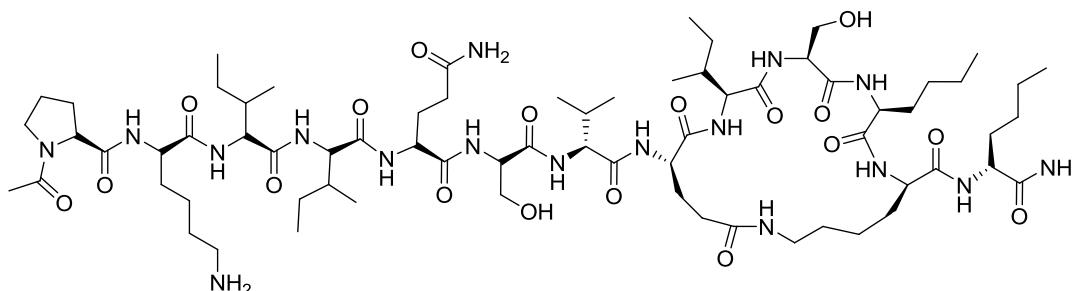
- **Ac-Pro-Lys-Ile-Ile-Gln-Ser-Val-Glu-Ile-Ser-Nle-Lys-Nle-NH₂ (1.18)**



A partir de 0.076 mmol de resina se obtuvieron 8.37 mg (7% rendimiento global) de un sólido algodonoso blanco, que se identificó como **1.18**.

HPLC-analítico (gradiente 1): $t_R = 9.48$ min. (>95% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para $C_{70}H_{125}N_{17}O_{19}$ 1507.9360; encontrada 1507.9338 (1.5 ppm).

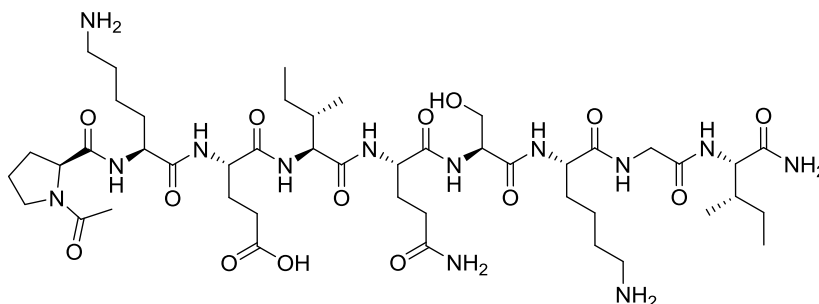
- **Ac-Pro-Lys-Ile-Ile-Gln-Ser-Val-ciclo[(CH₂)₂CONH(CH₂)₄]^{8,12}[Gly-Ile-Ser-Nle-Gly]Nle-NH₂ (1.12)**



A partir de 0.342 mmol de resina se obtuvieron 3 mg (1% de rendimiento global) de un sólido algodonoso blanco, que se identificó como **1.12**.

HPLC-analítico (gradiente 1): $t_R = 10.72$ min. (>97% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para $C_{70}H_{123}N_{17}O_{18}$ 1489.9234; encontrada 1489.9232 (0.14 ppm).

- **Ac-Pro-Lys-Glu-Ile-Gln-Ser-Lys-Gly-Ile-NH₂ (1.19)**

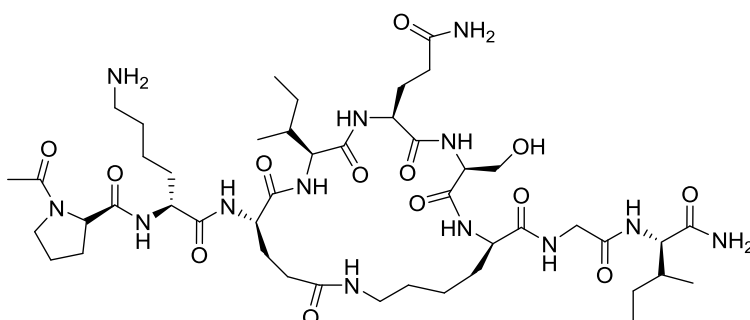


Siguiendo el procedimiento general, a partir de 0.136 mmol de resina se obtuvieron 2.92 mg (2% de rendimiento global) de un sólido

algodonoso de color blanco, que se identificó como **1.19**.

HPLC-analítico (gradiente 1): $t_R = 8.74$ min. (>92% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para $C_{46}H_{81}N_{13}O_{14}$ 1039.6038; encontrada 1039.6026 (1.13 ppm).

- **Ac-Pro-Lys-ciclo[(CH₂)₂CONH(CH₂)₄]^{3,7}[Gly-Ile-Gln-Ser-Gly]Gly-Ile-NH₂ (1.13)**

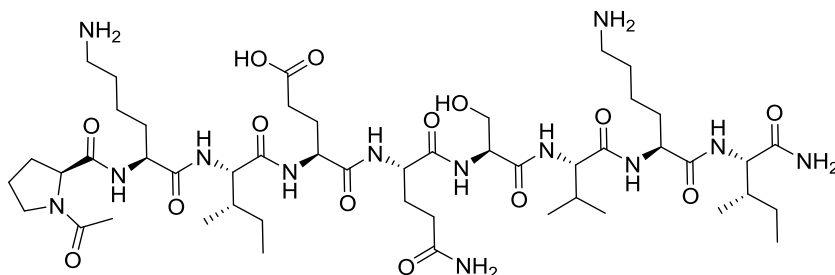


Partiendo de 0.084 mmol de resina se obtuvieron 13.72 mg (16% de rendimiento global) de un sólido algodonoso de color blanco,

que se identificó como el péptido cíclico **1.13**.

HPLC-analítico (gradiente 1): $t_R = 11.94$ min. (>96% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para $C_{46}H_{79}N_{13}O_{13}$ 1021.5936; encontrada 1021.5920 (1.49 ppm).

• **Ac-Pro-Lys-Ile-Glu-Gln-Ser-Val-Lys-Ile-NH₂ (1.20)**

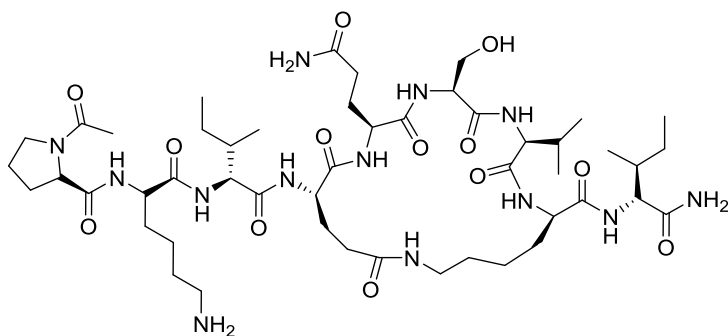


Siguiendo el método general a partir de 0.038 mmol de resina y tras purificar el crudo final de reacción se obtuvieron 2.33 mg

(6% rendimiento global) de un sólido algodonoso blanco, que se identificó como **1.20**.

HPLC-analítico (gradiente 1): $t_R = 12.08$ min. (>96% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para $C_{49}H_{87}N_{13}O_{14}$ 1081.6510; encontrada 1081.6495 (1.37 ppm).

• **Ac-Pro-Lys-Ile-ciclo[(CH₂)₂CONH(CH₂)₄]^{4,8}[Gly-Gln-Ser-Val-Gly]Ile-NH₂ (1.14)**



Partiendo de 0.076 mmol de resina se sintetizó el péptido anclado a la resina según el protocolo general descrito. Tras ciclación, desanclaje y purificación se obtuvieron 19.52 mg (24% de

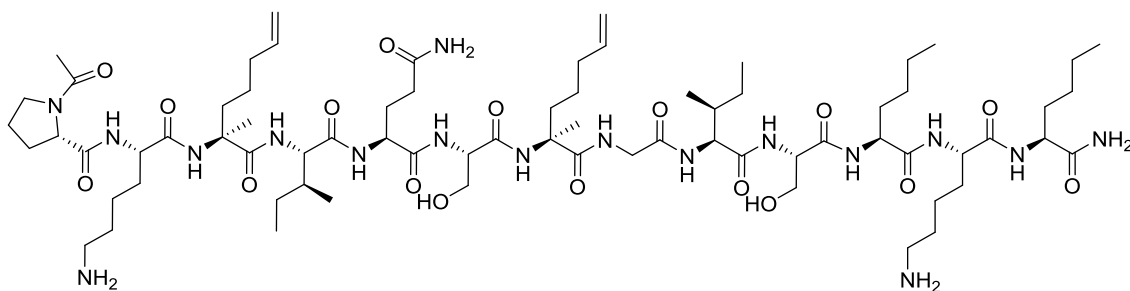
rendimiento global) de un sólido algodonoso blanco, que se identificó como **1.14**.

HPLC-analítico (gradiente 1): $t_R = 6.13$ min. (>95% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para $C_{49}H_{85}N_{13}O_{13}$ 1063.6397; encontrada 1063.6390 (0.66 ppm).

Péptidos cíclicos con puentes hidrocarbonados (1.37, 1.41 y 1.44) y precursores lineales (1.36 y 1.40)

Síntesis de los precursores lineales 1.36 y 1.40

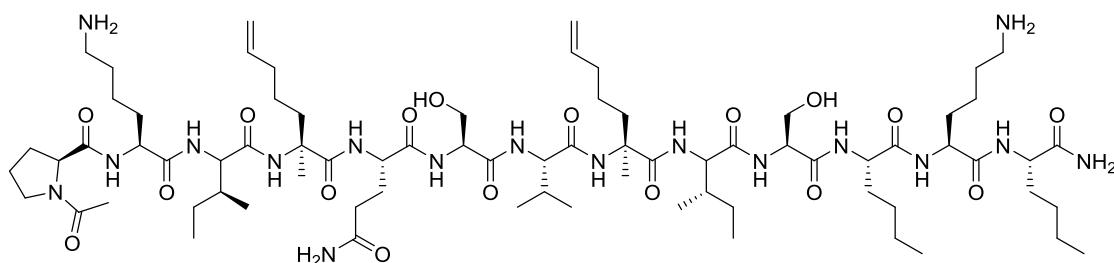
• **Ac-Pro-Lys-Ala-Ile-Gln-Ser-Ala-Gly-Ile-Ser-Nle-Lys-Nle-NH₂ (1.36)**



Partiendo de 0.038 mmol de resina y siguiendo el protocolo general de elongación (apartado 4.3.2), incorporando el residuo de Fmoc-*S*-Ala-(4'-pentenil)-OH según corresponda, se obtuvo el correspondiente péptido lineal protegido en su forma Fmoc (peptidil-resina **1.34**). La posterior acetilación del extremo *N*-terminal (apartado 4.3.3) y desanclaje del péptido de la resina (apartado 4.3.6) condujo al crudo de reacción, que tras purificación rindió 5.25 mg (9% rendimiento global) de un sólido algodonoso blanco, que se identificó como **1.36**.

HPLC-analítico (gradiente 1): t_R = 10.11 min. (>99% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para C₇₂H₁₂₇N₁₇O₁₇ 1501.9596; encontrada 1501.9600 (0.31 ppm).

• **Ac-Pro-Lys-Ile-Ala-Gln-Ser-Val-Ala-Gly-Ile-Ser-Nle-Lys-Nle-NH₂ (1.40)**

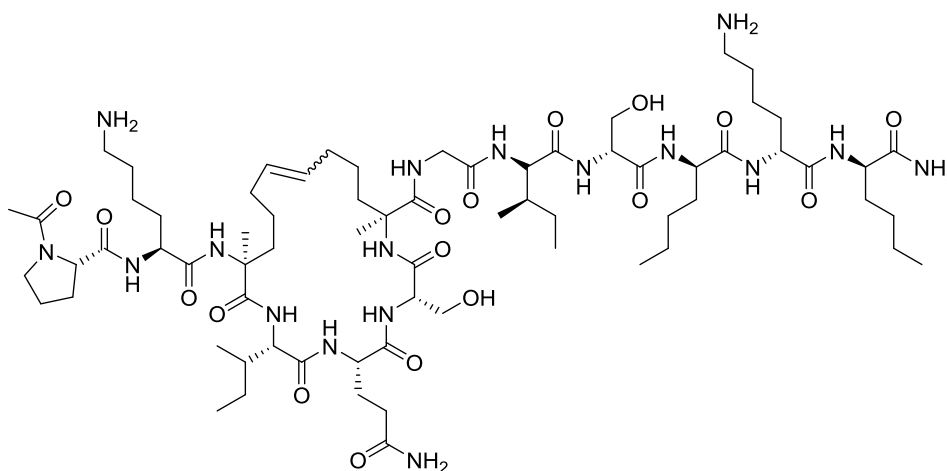


A partir de 0.03 mmol de resina y siguiendo el protocolo general de elongación (apartado 4.3.2) se obtuvo el correspondiente péptido lineal protegido en su forma Fmoc (peptidil-resina **1.38**). La posterior acetilación del extremo *N*-terminal (apartado 4.3.3) y desanclaje del péptido de la resina (apartado 4.3.6) condujo al crudo de reacción, que tras purificación rindió 2.5 mg (5% rendimiento global) de un sólido algodonoso blanco, que se identificó como **1.40**.

HPLC-analítico (gradiente 1): t_R = 6.08 min. (>97% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para C₇₃H₁₂₉N₁₇O₁₇ 1515.9733; encontrada 1515.9752 (-1.29 ppm).

Síntesis de los péptidos cíclicos 1.37, 1.41 y 1.44.

- **(*E/Z*)-Ac-Pro-Lys-ciclo[(CH₂)₃CH=CH(CH₂)₃]^{3,7}[(*D*)-Ala-Ile-Gln-Ser-Ala]-Gly-Ile-Ser-Nle-Lys-Nle-NH₂ (1.37a y 1.37b)**



A partir de 0.19 mmol de resina y una vez obtenida la peptidil-resina **1.34**, se lleva a cabo la reacción de metátesis⁶. Así, sobre un vial de microondas con el péptido lineal anclado a la resina (previamente hinchada) protegido en forma de Fmoc (**1.34**) (1 eq.), se añade bajo atmósfera de argón el catalizador de Grubbs de segunda generación (0.2 eq.). Se cierra el vial y se añade DCM seco (10 volúmenes) y un 10% en volumen de una disolución de LiCl 4.0 M en DMF. Se burbujea la disolución con argón durante 5 minutos. La mezcla se calienta en el microondas a 75 °C durante 1 hora.⁷ La peptidil-resina se lava con una mezcla de DCM:DMSO, 1:1 en volumen, para eliminar el Ru⁸⁻¹⁰, y posteriormente se realiza un lavado estándar, obteniéndose la peptidil-resina **1.35**. Seguidamente, se lleva a cabo la acetilación y desanclaje del péptido de la resina. El crudo final (mezcla 1:6 de isómeros *E/Z*, determinada por HPLC) se purifica en fase reversa por HPLC semipreparativo (gradiente: 20% de CH₃CN hasta 30% de CH₃CN en 40 min.), para dar 3.51 mg (1% de rendimiento global) del isómero minoritario **1.37a** y 11.36 mg (4% de rendimiento global) del isómero mayoritario **1.37b**, ambos como sólidos algodonosos de color blanco.

1.37a: HPLC-analítico (gradiente 1): *t_R* = 6.90 min. (>96% pureza). **HRMS** (ESI positivo, *m/z*): calculada para C₇₀H₁₂₃N₁₇O₁₇ 1473.9283; encontrada 1473.9302 (1.32 ppm).

Tabla 4.3. Desplazamientos químicos de ^1H - y de ^{13}C -RMN (en ppm) del isómero minoritario **1.37a***.

Residuo	HN	$^{13}\text{C}_\alpha$	C_αH	$^{13}\text{C}_\beta$	C_βH	Otros
CH₃CO		24.1	2.11			
Pro1	-	62.7	4.39	32.8	1.92, 2.31	C_γH 2.00, 2.00; $^{13}\text{C}_\gamma$ 27.2 C_δH 3.65, 3.65; $^{13}\text{C}_\delta$ 51.5
Lys2	8.57	56.7	4.25	32.8	1.77, 1.85	C_γH 1.45, 1.51; $^{13}\text{C}_\gamma$ 25.0 C_δH 1.68, 1.68; $^{13}\text{C}_\delta$ 28.9 $\text{C}_\epsilon\text{H}$ 2.99, 2.99; $^{13}\text{C}_\epsilon$ 41.8; N_ζH_3 7.64
Ala3	8.24	----	----	nd**	1.23, 1.85	$\text{C}_{\beta 1}\text{H}_3$ 1.49; $^{13}\text{C}_{\beta 1}$ 25.1 C_γH nd; $^{13}\text{C}_\gamma$ nd** C_δH 1.94, 2.00; $^{13}\text{C}_\delta$ 34.0 $\text{C}_\epsilon\text{H}$ 5.36; $^{13}\text{C}_\epsilon$ nd**
Ile4	7.65	62.8	3.96	38.2	1.95	$\text{C}_{\gamma 1}\text{H}$ 1.32, 1.50; $^{13}\text{C}_{\gamma 1}$ 28.0 $\text{C}_{\gamma 2}\text{H}_3$ 0.97; $^{13}\text{C}_{\gamma 2}$ 17.8 $\text{C}_{\delta 1}\text{H}_3$ 0.91; $^{13}\text{C}_{\delta 1}$ 13.2
Gln5	8.26	57.4	4.15	28.6	2.13, 2.21	C_γH 2.47, 2.47; $^{13}\text{C}_\gamma$ 34.2 $\text{N}_\epsilon\text{H}_2$ 7.03, 7.71
Ser6	7.99	58.7	4.49	63.8	3.77, 3.92	
Ala7	8.47	----	----	nd**	nd**	$\text{C}_{\beta 1}\text{H}_3$ 1.45; $^{13}\text{C}_{\beta 1}$ 23.5 C_γH 1.29, 1.65; $^{13}\text{C}_\gamma$ nd** C_δH 1.91, 2.12; $^{13}\text{C}_\delta$ 34.4 $\text{C}_\epsilon\text{H}$ 5.37; $^{13}\text{C}_\epsilon$ nd**
Gly8	8.47	45.6	3.86, 3.92			
Ile9	7.91	61.6	4.15	38.4	1.98	$\text{C}_{\gamma 1}\text{H}$ 1.19, 1.50; $^{13}\text{C}_{\gamma 1}$ 27.5 $\text{C}_{\gamma 2}\text{H}_3$ 0.93; $^{13}\text{C}_{\gamma 2}$ 17.4 $\text{C}_{\delta 1}\text{H}_3$ 0.88; $^{13}\text{C}_{\delta 1}$ 13.0
Ser10	8.43	58.3	4.45	63.6	3.87, 3.87	
Nle11	8.36	56.9	4.24	33.3	1.75, 1.81	C_γH 1.35, 1.38; $^{13}\text{C}_\gamma$ 30.0 C_δH 1.31, 1.31; $^{13}\text{C}_\delta$ 24.3 $\text{C}_\epsilon\text{H}_3$ 0.87; $^{13}\text{C}_\epsilon$ 15.9
Lys12	8.37	56.1	4.30	nd**	1.78, 1.85	C_γH 1.43, 1.47; $^{13}\text{C}_\gamma$ 24.8 C_δH 1.68, 1.68; $^{13}\text{C}_\delta$ 29.2 $\text{C}_\epsilon\text{H}$ 2.98, 2.98; $^{13}\text{C}_\epsilon$ 41.9 N_ζH_3 7.62
Nle13	8.33	56.4	4.22	33.3	1.74, 1.81	C_γH 1.33, 1.33; $^{13}\text{C}_\gamma$ 30.0 C_δH 1.33, 1.33; $^{13}\text{C}_\delta$ 24.3 $\text{C}_\epsilon\text{H}_3$ 0.87; $^{13}\text{C}_\epsilon$ 15.9 CONH_2 7.21, 7.71

*Los espectros se han adquirido en disolución de $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1 (v/v) a pH 3.0 y 5 °C. **nd: no determinado.

PARTE EXPERIMENTAL

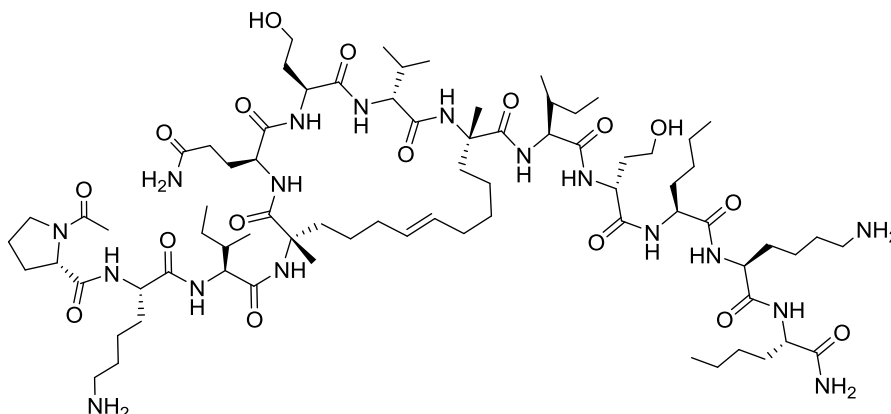
1.37b: HPLC-analítico (gradiente 1): $t_R = 7.47$ min. (>96% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para $C_{70}H_{123}N_{17}O_{17}$ 1473.9283; encontrada 1473.9262 (-1.41 ppm).

Tabla 4.4. Desplazamientos químicos de 1H - y de ^{13}C -RMN (en ppm) del isómero mayoritario **1.37b**.*

Residuo	HN	$^{13}C_\alpha$	$C_\alpha H$	$^{13}C_\beta$	$C_\beta H$	Otros
CH₃CO		24.1	2.13			
Pro1	-	62.9	4.38	32.8	1.92, 2.31	$C_\gamma H$ 2.00, 2.00; $^{13}C_\gamma$ 27.1 $C_\delta H$ 3.66, 3.66; $^{13}C_\delta$ 51.4
Lys2	8.52	56.5	4.29	32.7	1.77, 1.91	$C_\gamma H$ 1.46, 1.53; $^{13}C_\gamma$ 25.0 $C_\delta H$ 1.69, 1.69; $^{13}C_\delta$ 28.8 $C_\epsilon H$ 2.99, 2.99; $^{13}C_\epsilon$ 41.9; $N_\zeta H_3$ 7.64
Ala3	8.35	----	----	nd**	1.88, 2.04	$C_{\beta 1} H_3$ 1.47; $^{13}C_{\beta 1}$ 21.9 $C_\gamma H$ 1.20, 1.59; $^{13}C_\gamma$ nd** $C_\delta H$ 1.95, 2.04; $^{13}C_\delta$ nd** $C_\epsilon H$ 5.47; $^{13}C_\epsilon$ nd**
Ile4	7.98	63.6	3.93	38.3	1.96	$C_{\gamma 1} H$ 1.32, 1.54; $^{13}C_{\gamma 1}$ nd** $C_{\gamma 2} H_3$ 0.96; $^{13}C_{\gamma 2}$ 17.6 $C_{\delta 1} H_3$ 0.91; $^{13}C_{\delta 1}$ 13.5
Gln5	8.00	58.1	4.11	28.2	2.21, 2.21	$C_\gamma H$ 2.45, 2.45; $^{13}C_\gamma$ 34.3 $N_\epsilon H_2$ 7.03, 7.71
Ser6	7.81	nd	4.35	62.8	3.91, 3.98	
Ala7	8.29	----	----	nd**	1.68, 1.82	$C_{\beta 1} H_3$ 1.47; $^{13}C_{\beta 1}$ 22.9 $C_\gamma H$ 1.33, 1.41; $^{13}C_\gamma$ nd** $C_\delta H$ 1.91, 2.05; $^{13}C_\delta$ nd** $C_\epsilon H$ 5.47; $^{13}C_\epsilon$ nd**
Gly8	7.94	46.0	3.92, 3.92			
Ile9	7.76	62.1	4.12	38.4	1.99	$C_{\gamma 1} H$ 1.24, 1.59; $^{13}C_{\gamma 1}$ nd** $C_{\gamma 2} H_3$ 0.95; $^{13}C_{\gamma 2}$ 17.2 $C_{\delta 1} H_3$ 0.91; $^{13}C_{\delta 1}$ 13.1
Ser10	8.17	58.8	4.43	63.5	3.91, 3.91	
Nle11	8.23	57.1	4.23	33.2	1.75, 1.81	$C_\gamma H$ 1.35, 1.38; $^{13}C_\gamma$ 30.0 $C_\delta H$ 1.31, 1.31; $^{13}C_\delta$ 24.3 $C_\epsilon H_3$ 0.87; $^{13}C_\epsilon$ 15.9
Lys12	8.27	56.2	4.29	nd**	1.78, 1.85	$C_\gamma H$ 1.43, 1.47; $^{13}C_\gamma$ 24.8 $C_\delta H$ 1.69, 1.69; $^{13}C_\delta$ 29.2 $C_\epsilon H$ 2.98, 2.98; $^{13}C_\epsilon$ 41.9 $N_\zeta H_3$ 7.62
Nle13	8.26	56.4	4.21	33.2	1.74, 1.81	$C_\gamma H$ 1.32, 1.32; $^{13}C_\gamma$ 30.0 $C_\delta H$ 1.33, 1.33; $^{13}C_\delta$ 24.3 $C_\epsilon H_3$ 0.87; $^{13}C_\epsilon$ 15.9 $CONH_2$ 7.21, 7.66

*Los espectros se han adquirido en disolución de H_2O/D_2O 9:1 (v/v) a pH 3.0 y 5 °C. **nd: no determinado.

- **(E)-Ac-Pro-Lys-Ile-ciclo[(CH₂)₃CH=CH(CH₂)₃]^{4,8}[(D)-Ala-Gln-Ser-Val-Ala]-Ile-Ser-Nle-Lys-Nle-NH₂ (**1.41b**)**



Se partió de 0.33 mmol de resina y se sintetizó el péptido lineal anclado a la resina en su forma Fmoc (**1.38**) según el protocolo general de elongación descrito (apartado 4.3.2). A continuación, se llevó a cabo la reacción de metátesis, siguiendo un procedimiento similar al descrito para la síntesis de **1.37a** y **1.37b**, obteniéndose la peptidil-resina **1.39**. La purificación del crudo final liofilizado por HPLC semipreparativo, permitió aislar únicamente el isómero mayoritario, isómero *E* determinado por RMN (Tabla 4.5). Tras liofilizar y secar se obtuvieron 10 mg (2% de rendimiento global) de un sólido blanco y algodonoso que se identificó como **1.41b** (isómero mayoritario).

1.41b: HPLC-analítico (gradiente 6): t_R = 8.68 min. (>95% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para C₇₃H₁₂₉N₁₇O₁₇ 1515.9722; encontrada 1515.9752 (-1.99 ppm).

Tabla 4.5. Desplazamientos químicos de ¹H- y de ¹³C-RMN (en ppm) del isómero mayoritario **1.41b***.

Residuo	HN	¹³ C _α	C _α H	¹³ C _β	C _β H	Otros
CH ₃ CO		24.6	2.16			
Pro1		63.8	4.36	32.7	1.96, 2.34	C _γ H 2.04, 2.04; ¹³ C _γ 27.3 C _δ H 3.67, 3.73; ¹³ C _δ 51.5
Lys2	8.42	57.6	4.26	32.5	1.83, 1.83	C _γ H 1.44, 1.52; ¹³ C _γ 25.0 C _δ H 1.69, 1.69; ¹³ C _δ 29.1 C _ε H 3.00, 3.00; ¹³ C _ε 42.2; N _ε H ₃ 7.53
Ile3	7.84	64.2	3.94	38.0	1.98	C _{γ1} H 1.22, 1.54; ¹³ C _{γ1} 28.0 C _{γ2} H ₃ 0.91; ¹³ C _{γ2} 17.7 C _{δ1} H ₃ 0.88; ¹³ C _{δ1} 12.7

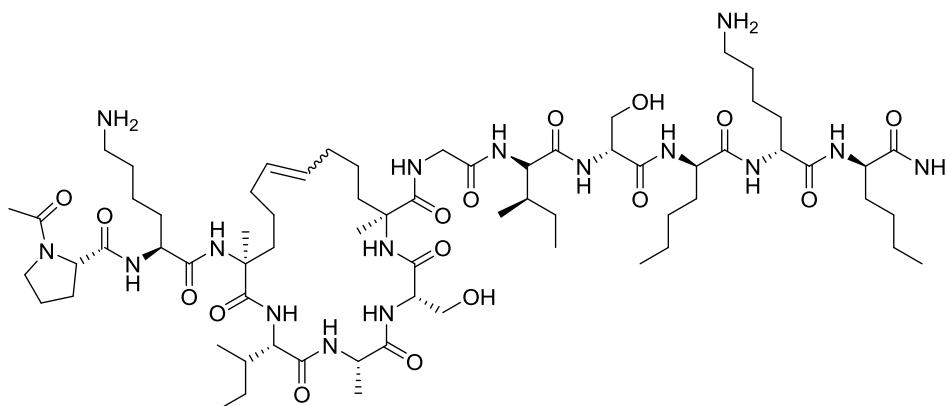
PARTE EXPERIMENTAL

Ala4	8.21	----	----	40.5	1.98, 1.98	C _β H ₃ 1.39; ¹³ C _β 22.3 C _γ H 1.06, 1.70; ¹³ C _γ 26.2 C _δ H 1.76, 1.96; ¹³ C _δ 29.7 C _ε H 5.36; ¹³ C _ε nd
Gln5	8.41	60.0	4.00	28.3	2.15, 2.15	C _γ H 2.53, 2.53; ¹³ C _γ 34.0 N _ε H ₂ 6.80, 7.36
Ser6	7.73	61.7	4.23	63.0	4.00, 4.04	
Val7	7.55	66.5	3.65	31.7	2.27	C _γ H ₃ 0.85; ¹³ C _γ 21.1 C _{γ'} H ₃ 0.94; ¹³ C _{γ'} 22.6
Ala8	8.22	----	----	40.8	1.60, 2.04	C _β H ₃ 1.40; ¹³ C _β 21.4 C _γ H 1.33, 1.39; ¹³ C _γ 27.0 C _δ H 1.69, 2.12; ¹³ C _δ 30.1 C _ε H 5.47; ¹³ C _ε nd
Ile9	7.99	64.2	3.95	38.2	1.98	C _γ 1H 1.37, 1.62; ¹³ C _γ 1 28.7 C _γ 2H ₃ 0.98; ¹³ C _γ 2 17.6 C _δ 1H ₃ 0.88; ¹³ C _δ 1 13.4
Ser10	7.72	60.9	4.34	63.6	3.91, 3.91	
Nle11	7.62	57.7	4.24	33.4	1.76, 1.87	C _γ H 1.25 1.44; ¹³ C _γ 30.8 C _δ H 1.21, 1.27; ¹³ C _δ 24.6 C _ε H ₃ 0.79; ¹³ C _ε 16.2
Lys12	7.84	56.9	4.24	32.4	1.89, 1.93	C _γ H 1.45, 1.52; ¹³ C _γ 25.1 C _δ H 1.70, 1.70; ¹³ C _δ 29.1 C _ε H 3.00, 3.00; ¹³ C _ε 42.3 N _ε H ₃ 7.53
Nle13	7.92	57.7	4.23	33.6	1.73, 1.82	C _γ H 1.32, 1.37; ¹³ C _γ 30.2 C _δ H 1.30, 1.30; ¹³ C _δ 24.4 C _ε H ₃ 0.87; ¹³ C _ε 16.1 CONH ₂ 7.04, 7.38

*Los espectros se han adquirido en disolución de H₂O/D₂O 9:1 (v/v) a pH 3.0 y 35 °C.

**nd: no determinado.

- **(*E/Z*)-Ac-Pro-Lys-ciclo[(CH₂)₃CH=CH(CH₂)₃]^{3,7}[(*D*)-Ala-Ile-Ala-Ser-Ala]-Gly-Ile-Ser-Nle-Lys-Nle-NH₂ (1.44a y 1.44b)**



Se partió de 0.114 mmol de resina y se sintetizó el péptido lineal anclado a la resina en su forma Fmoc (**1.42**) según el protocolo general de elongación descrito

(apartado 4.3.2). A continuación, se llevó a cabo la reacción de metátesis, siguiendo un procedimiento similar al descrito para la síntesis de **1.37a** y **1.37b**, obteniéndose la peptidil-resina **1.43**. La purificación del crudo final liofilizado (mezcla 1:4 de los isómeros *E* y *Z*, determinada por HPLC analítico) por HPLC semipreparativo, permitió la separación de los dos isómeros (*E/Z*). Tras liofilizar y secar se obtuvieron 2.18 mg (1% de rendimiento global) de un sólido blanco y algodonoso que se identificó como **1.44a** (isómero minoritario) y 6.50 mg (4% de rendimiento global) de otro sólido algodonoso blanco que se identificó como **1.44b** (isómero mayoritario).

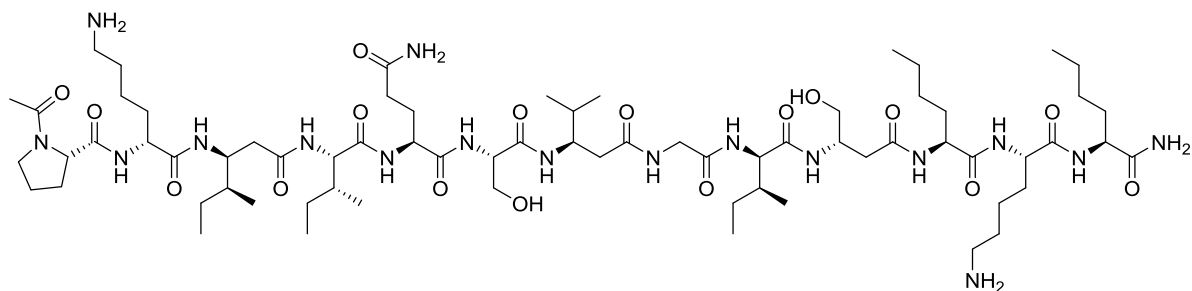
1.44a: HPLC-analítico (gradiente 1): $t_R = 8.83$ min. (>93% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para $C_{68}H_{120}N_{16}O_{16}$ 1416.9068; encontrada 1416.8999 (-4.91 ppm).

1.44b: HPLC-analítico (gradiente 1): $t_R = 9.66$ min. (>99% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para $C_{68}H_{120}N_{16}O_{16}$ 1416.9068; encontrada 1416.9081 (0.92 ppm).

5.4.3. Síntesis de los foldámeros (Serie 3) (1.45-1.53)

Procedimiento general: a partir de 0.089-0.140 mmol de resina, se lleva a cabo la elongación de la cadena peptídica según el protocolo descrito (apartado 4.3.2), introduciendo los β^3 -aminoácidos Fmoc- β^3 -Ala-OH, Fmoc- β^3 -Ile-OH, Fmoc- β^3 -Nle-OH, Fmoc- β^3 -Pro-OH, Fmoc- β^3 -Ser(^tBu)-O o Fmoc- β^3 -Val-OH, en las posiciones requeridas siguiendo los patrones de sustitución $\alpha\beta\alpha\alpha\beta$ o $\alpha\alpha\alpha\beta$. Tras acetilar y desanclar el péptido de la resina poliestirénica, según los protocolos descritos en los apartados 4.3.3 y 4.3.6 respectivamente, se realiza la purificación de los mismos por cromatografía de media presión (HPFC) en un equipo de Biotage® en fase reversa (0% inicial de CH_3CN hasta 100% final de CH_3CN).

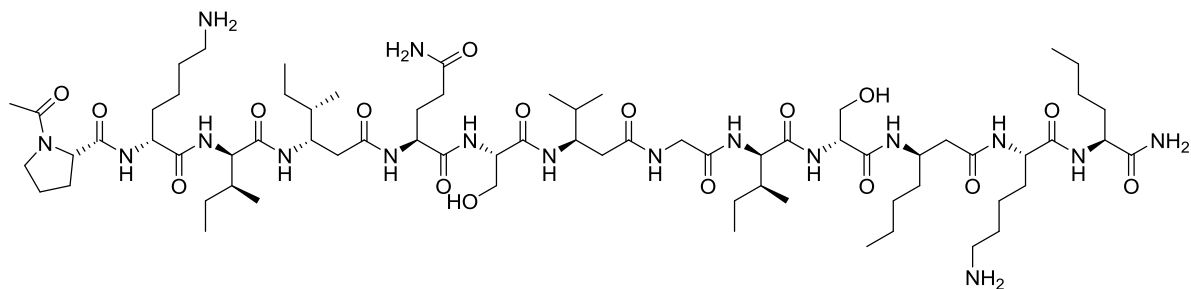
• **Ac-Pro-Lys- β^3 Ile-Ile-Gln-Ser- β^3 Val-Gly-Ile- β^3 Ser-Nle-Lys-Nle-NH₂ (1.45)**



El procedimiento general se sigue con 0.140 mmol de resina. Tras purificar el crudo final de reacción, liofilizar y secar se obtienen 28.05 mg (13% rendimiento global) de un sólido blanco algodonoso, que se identifica como **1.45**.

HPLC-analítico (gradiente 1): t_R = 8.62 min. (>91% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para C₇₀H₁₂₇N₁₇O₁₇ 1477.9596; encontrada 1477.9604 (0.58 ppm).

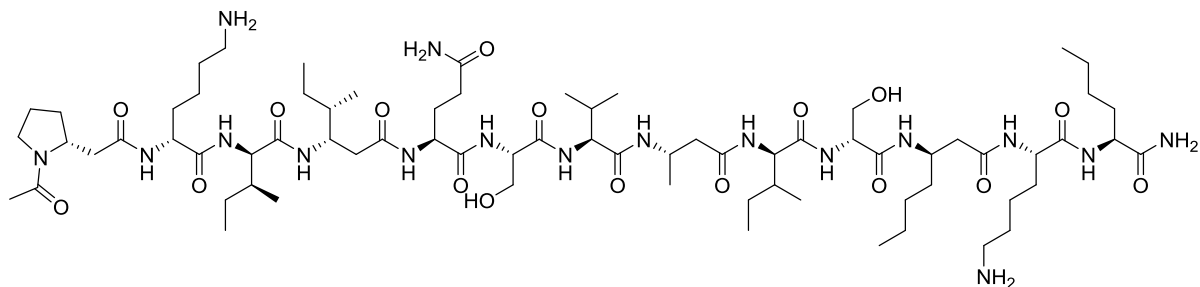
• **Ac-Pro-Lys-Ile- β^3 Ile-Gln-Ser- β^3 Val-Ile-Ser- β^3 Nle-Lys-Nle-NH₂ (1.46)**



Según el procedimiento general, a partir de 0.140 mmol de resina se obtuvieron 48.05 mg (23% rendimiento global) de un sólido algodonoso blanco, que se identificó como **1.46**.

HPLC-analítico (gradiente 1): t_R = 8.15 min. (>98% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para C₇₀H₁₂₇N₁₇O₁₇ 1477.9596; encontrada 1477.9612 (1.11 ppm).

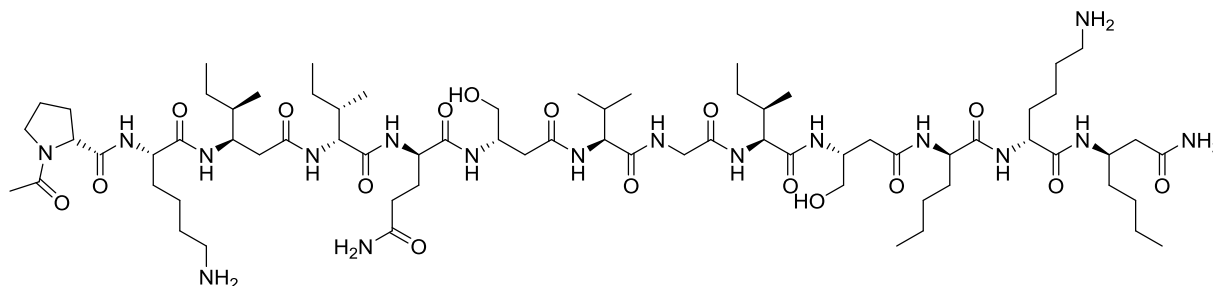
• **Ac- β^3 Pro-Lys-Ile- β^3 Ile-Gln-Ser-Val- β^3 Ala-Ile-Ser- β^3 Nle-Lys-Nle-NH₂ (1.47)**



A partir de 0.140 mmol de resina y tras purificar el crudo final de reacción, liofilizar y secar se obtuvieron 45.21 mg (21% rendimiento global) de un sólido algodonoso de color blanco, que se identificó como **1.47**.

HPLC-analítico (gradiente 1): $t_R = 9.61$ min. (>95% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para $C_{72}H_{131}N_{17}O_{17}$ 1505.9909; encontrada 1505.9903 (-0.39 ppm).

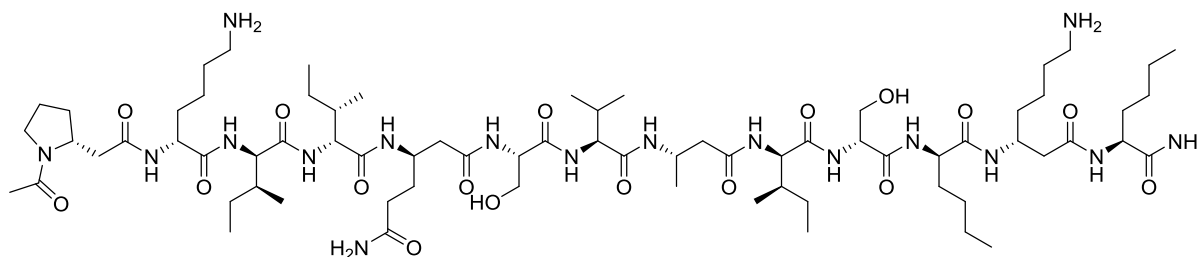
• **Ac-Pro-Lys- β^3 Ile-Ile-Gln- β^3 Ser-Val-Gly-Ile- β^3 Ser-Nle-Lys- β^3 Nle-NH₂ (1.48)**



Según el procedimiento general a partir de 0.140 mmol de resina se obtuvieron 53.74 mg (26% rendimiento global) de un sólido algodonoso blanco, que se identificó como **1.48**.

HPLC-analítico (gradiente 1): $t_R = 8.58$ min. (>98% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para $C_{71}H_{129}N_{17}O_{17}$ 1491.9752; encontrada 1491.9721 (-2.09 ppm).

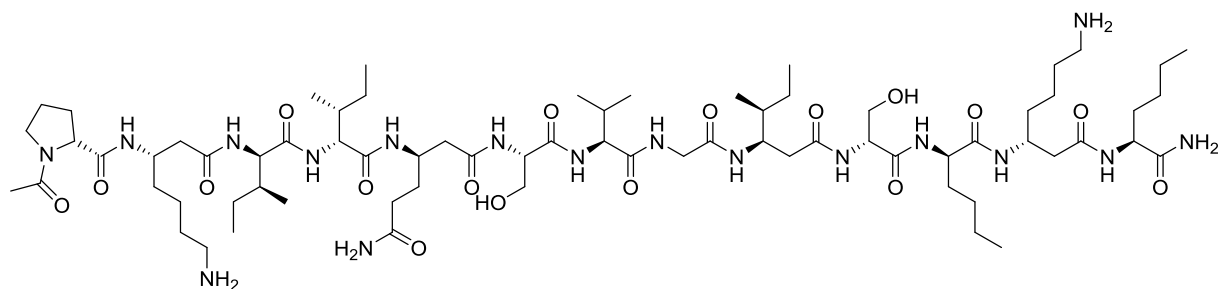
• **Ac- β^3 Pro-Lys-Ile-Ile- β^3 Gln-Ser-Val- β^3 Ala-Ile-Ser-Nle- β^3 Lys-Nle-NH₂ (1.49)**



Partiendo de 0.112 mmol de resina, siguiendo el procedimiento general, se obtuvieron tras purificar el crudo final de reacción, liofilizar y secar, 37.67 mg (22% rendimiento global) de un sólido algodonoso blanco, que se identificó como **1.49**.

HPLC-analítico (gradiente 1): $t_R = 8.66$ min. (>94% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para $C_{72}H_{131}N_{17}O_{17}$ 1505.9909; encontrada 1505.9916 (-0.5 ppm).

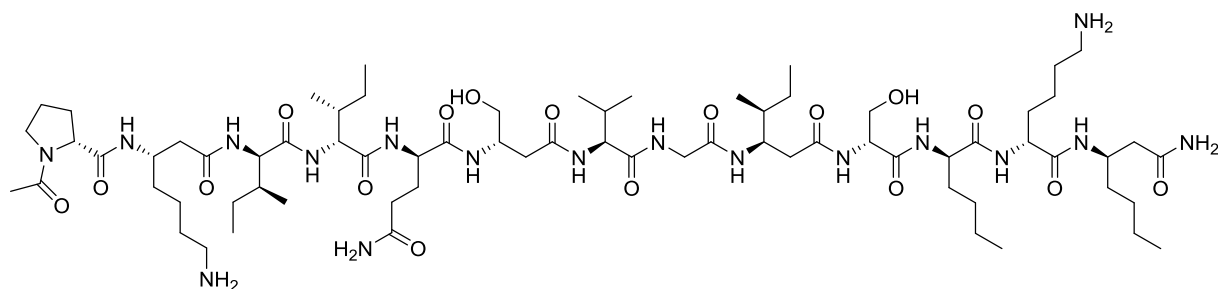
• **Ac-Pro- β^3 Lys-Ile-Ile- β^3 Gln-Ser-Val-Gly- β^3 Ile-Ser-Nle- β^3 Lys-Nle-NH₂ (1.50)**



A partir de 0.112 mmol de resina y tras purificar el crudo final de reacción, liofilizar y secar se obtuvieron 76.14 mg (45% rendimiento global) de un sólido alodonoso blanco, que se identificó como **1.50**.

HPLC-analítico (gradiente 1): t_R = 7.72 min. (>99% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para C₇₁H₁₂₉N₁₇O₁₇ 1491.9752; encontrada 1491.9745 (-0.52 ppm).

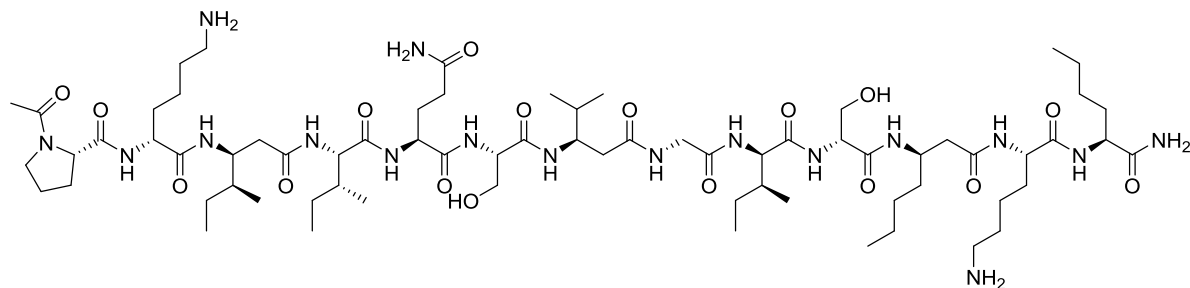
• **Ac-Pro- β^3 Lys-Ile-Ile-Gln- β^3 Ser-Val-Gly- β^3 Ile-Ser-Nle-Lys- β^3 Nle-NH₂ (1.51)**



A partir de 0.089 mmol de resina, tras purificar el crudo final de reacción, se obtuvieron 15.07 mg (11% rendimiento global) de un sólido alodonoso blanco, que se identificó como **1.51**.

HPLC-analítico (gradiente 1): t_R = 8.26 min. (>96% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para C₇₁H₁₂₉N₁₇O₁₇ 1491.9752; encontrada 1491.9701 (-3.47 ppm).

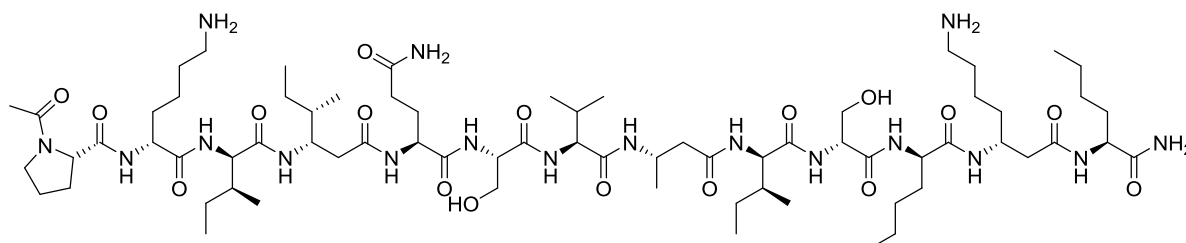
• **Ac-Pro-Lys- β^3 Ile-Ile-Gln-Ser- β^3 Val-Gly-Ile-Ser- β^3 Nle-Lys-Nle-NH₂ (1.52)**



Seguendo el procedimiento general, a partir de 0.140 mmol de resina se obtuvieron 39.93 mg (19% rendimiento global) de un sólido algodonoso blanco, que se identificó como **1.52**.

HPLC-analítico (gradiente 1): $t_R = 7.90$ min. (>94% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para $C_{70}H_{127}N_{17}O_{17}$ 1477.9596; encontrada 1477.9613 (1.18 ppm).

• **Ac-Pro-Lys-Ile- β^3 Ile-Gln-Ser-Val- β^3 Ala-Ile-Ser-Nle- β^3 Lys-Nle-NH₂ (1.53)**



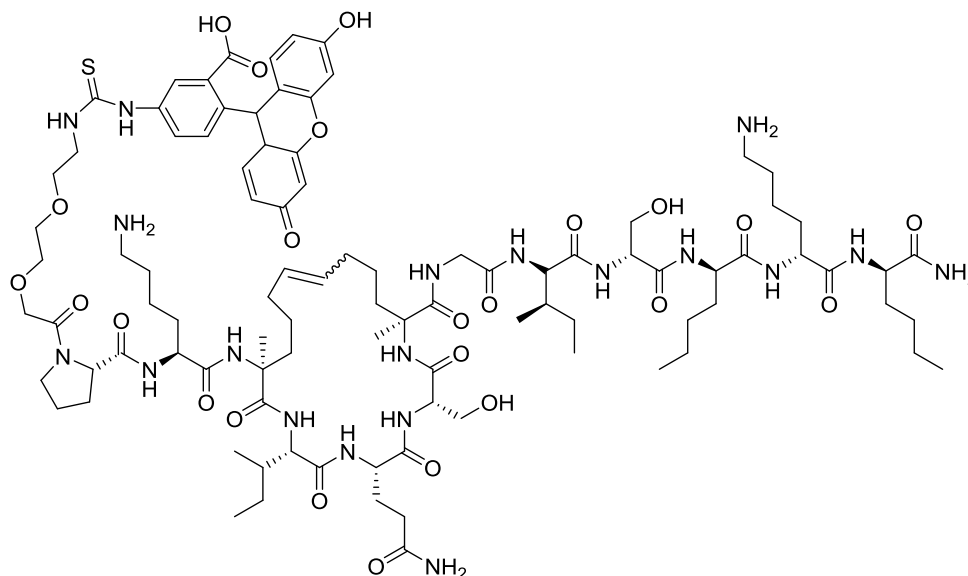
A partir de 0.140 mmol de resina y tras purificar el crudo final de reacción, se obtuvieron 47.77 mg (23% rendimiento global) de un sólido algodonoso blanco, que se identificó como **1.53**.

HPLC-analítico (gradiente 1): $t_R = 8.58$ min. (>97% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para $C_{71}H_{129}N_{17}O_{17}$ 1491.9752; encontrada 1491.9821 (4.58 ppm).

5.4.4. Síntesis de los péptidos portadores de sondas fluorescentes (2.03 y 2.04)

Procedimiento general: se realiza la elongación de los péptidos siguiendo el protocolo general descrito (apartado 4.3.2) hasta obtener el péptido con la longitud deseada en su forma Fmoc. A continuación se desprotege el grupo Fmoc y se hace reaccionar la peptidil-resina (1 eq.) con ácido {2-[2-(Fmoc-amino)etoxi]etoxi}acético (Fmoc-PEG) (2 eq.), empleando HCTU (2 eq.) como agente de acoplamiento y DIEA (4 eq.) como base, y se deja 2 horas a temperatura ambiente con agitación orbital. Se desprotege de nuevo el grupo Fmoc y sobre la peptidil-resina con el extremo N-terminal desprotegido se añaden fluoresceína (FITC) (2 eq.) y DIEA (3 eq.) y se mantiene durante toda la noche a temperatura ambiente con agitación orbital. Se lava la resina y se desancla siguiendo el protocolo descrito (apartado 4.3.6). El crudo se purifica mediante HPLC semipreparativo en fase reversa (0% inicial de CH₃CN hasta 100% final de CH₃CN).

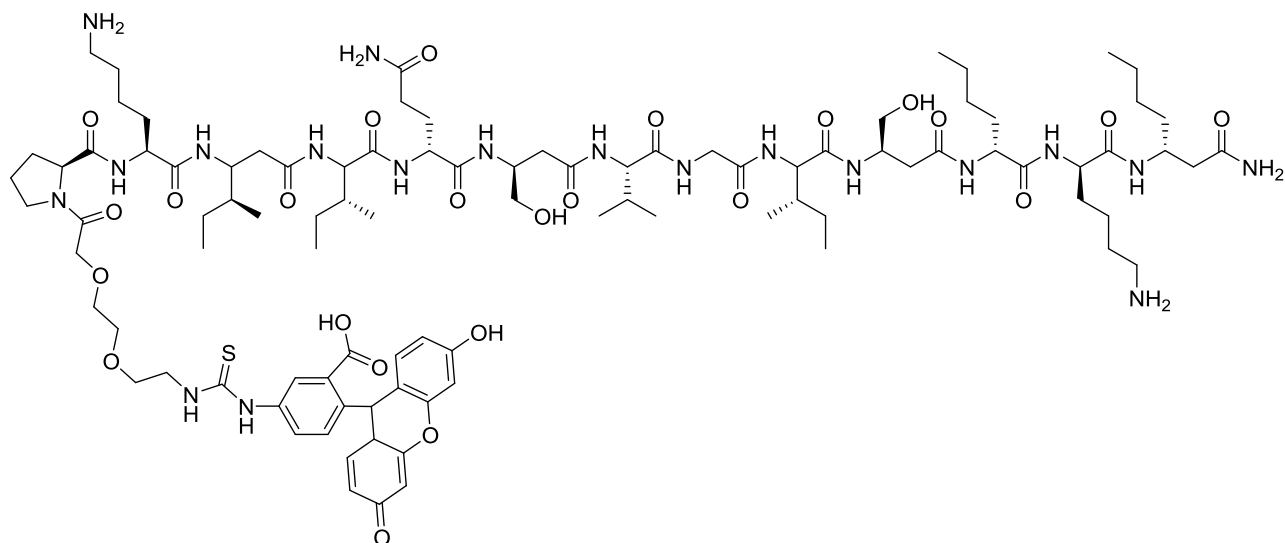
- **Fluoresceína-PEG-Pro-Lys-ciclo[(CH₂)₃CH=CH(CH₂)₃]^{3,7}[(D)-Ala-Ile-Gln-Ser-Ala]-Gly-Ile-Ser-Nle-Lys-Nle-NH₂ (2.03)**



Seguendo el procedimiento general, se parte de 0.038 mmol de resina y se sintetiza el péptido lineal **1.34** en su forma Fmoc. A continuación, se lleva a cabo una ciclación empleando una reacción de metátesis (**1.35**), como se describe para la síntesis de **1.37**, **1.41** y **1.44**. Seguidamente, se desprotege el grupo Fmoc del extremo *N*-terminal y se introducen el Fmoc-PEG (peptidil-resina **2.05**) y la fluoresceína (FITC), sucesivamente. El péptido fluorescente sintetizado se desancla de la resina y el crudo liofilizado obtenido se purifica por HPLC semipreparativo. Se obtuvieron 2.20 mg, tras liofilizar y secar (3% de rendimiento global), de un sólido amarillo que se identifica como **2.03**.

HPLC-analítico (gradiente 1): *t_R* = 9.62 min. (99% pureza). **HRMS** (ESI positivo, *m/z*): calculada para C₉₅H₁₄₃N₁₉O₂₄S 1966.0274; encontrada 1966.0339 (3.3 ppm).

• FITC-Pro-Lys- β^3 Ile-Ile-Gln- β^3 Ser-Val-Gly-Ile- β^3 Ser-Nle-Lys- β^3 Nle-NH₂ (2.04)

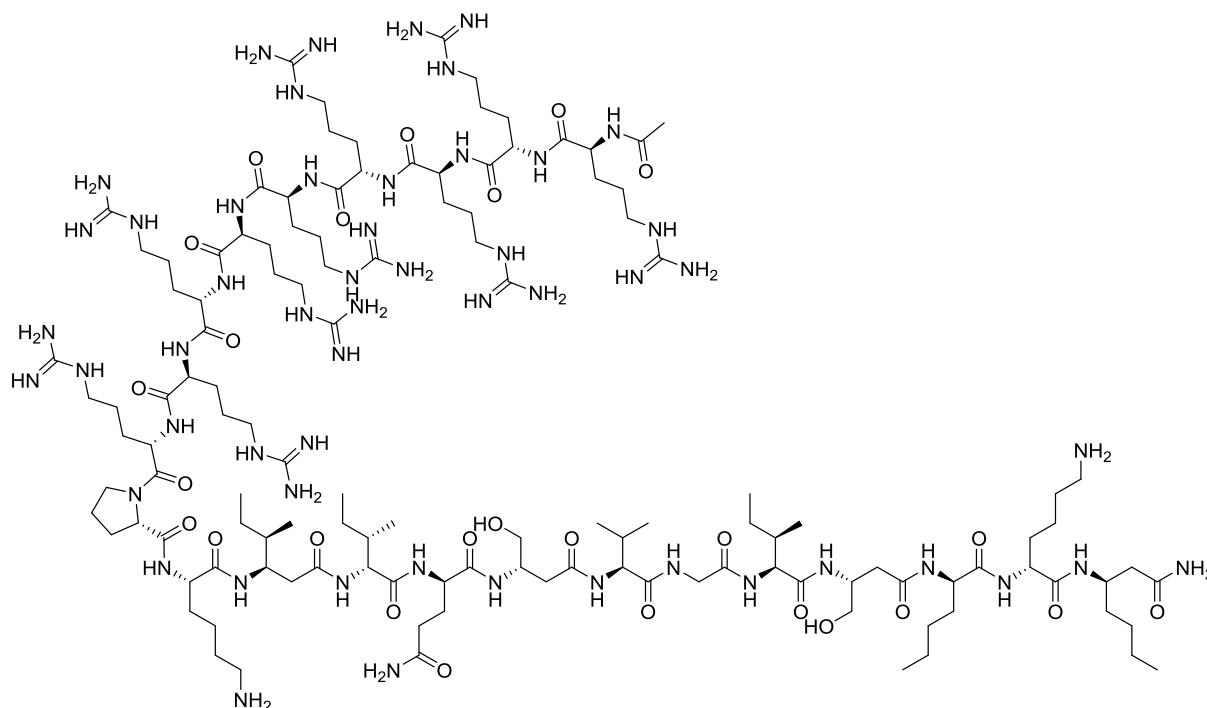


Se sigue el procedimiento general con 0.14 mmol de resina, obteniéndose, tras purificación, 12.37 mg, 14% de rendimiento global, de un sólido amarillo que se identifica como **2.04**.

HPLC-analítico (gradiente 1): t_R = 9.24 min. (>95% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para C₉₆H₁₄₉N₁₉O₂₄S 1984.0744; encontrada 1984.0754 (0.54 ppm).

5.4.5. Síntesis del foldámero conjugado con un péptido transportador (2.10)

- **Ac-(Arg)₉-Pro-Lys-β³Ile-Ile-Gln-β³Ser-Val-Gly-Ile-β³Ser-Nle-Lys-β³Nle-NH₂ (2.10)**



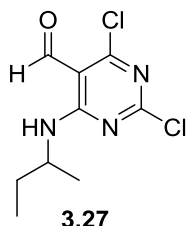
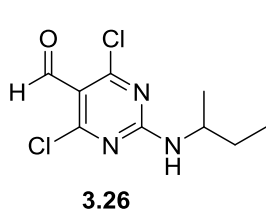
Seguindo el procedimiento general de elongación de los foldámeros (apartado 4.4.3), se partió de 0.168 mmol de resina. Tras eliminación del grupo Fmoc del extremo *N*-terminal, acetilación, desanclaje de la resina poliestirénica, y purificación se obtuvieron 18 mg (7% rendimiento global) de un sólido algodonoso blanco que se identificó como **2.10**.

HPLC-analítico (gradiente 1): $t_R = 4.23$ min. (>91% pureza). **MALDI-TOF-MS** para $C_{125}H_{237}N_{53}O_{26}$ 2899.08.

5.5. Síntesis de peptidomiméticos de naturaleza no peptídica

5.5.1. Síntesis de 2-alkil-4,6-dicloroaminopirimidina-5-carbaldehidos en disolución (3.26, 3.32 y 3.33)

- 2-(*sec*-Butilamino)-4,6-dicloropirimidina-5-carbaldehido y 4-(*sec*-butilamino)-2,6-dicloropirimidina-5-carbaldehido (3.26 y 3.27)



A una disolución de 2,4,6-tricloropirimidina-5-carbaldehido (1 g, 4.73 mmol) en DCM anhidro (20 mL), a -78 °C bajo atmósfera de argón, se añade lentamente una disolución de *sec*-butilamina (0.43 mL, 4.29 mmol) y

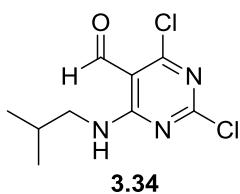
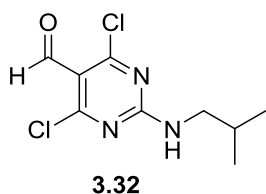
DIEA (8.6 mL) en DCM seco (8 mL), y se deja reaccionar a esa temperatura durante 3 horas. Pasado ese tiempo la mezcla de reacción se lava con agua (2 x 20 mL) y con una disolución de NaCl saturada (20 mL). La fase orgánica resultante se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora. El crudo resultante se purifica mediante cromatografía de media presión en un equipo Biotage® (hexano:AcOEt, 9:1). De las fracciones de menor movilidad se obtienen 155 mg (15% de rendimiento) de un sólido amarillo que se identificó como **3.26**.

TLC R_f (hexano:AcOEt, 95:5): 0.14. **HPLC-MS** (ES, positivo) (gradiente 1): t_R = 9.40 min., m/z 248.2 [M(³⁵Cl³⁵Cl)+H]⁺, 250.3 [M(³⁵Cl³⁷Cl)+H]⁺, 252.1 [M(³⁷Cl³⁷Cl)+H]⁺. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.96 (t, J = 7.4 Hz, 3H, CH₃CH₂), 1.24 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CH₃CH), 1.48-1.69 (m, 2H, CH₂), 4.11 (m, 1H, CH), 5.67 (sa, 1H, NH), 10.25 (s, 1H, CHO). **¹³C RMN** (100 MHz, CDCl₃) δ: 10.3 (CH₃), 20.2 (CH₃), 29.5 (CH), 49.5 (CH₂), 114.1 (C_{Ar}-CHO), 160.0, 163.8, 165.2 (3C_{Ar}), 185.1 (CHO).

De las fracciones de mayor movilidad se obtuvieron 860 mg (81% de rendimiento) de un aceite incoloro que se identificó como **3.27**.

TLC R_f (hexano:AcOEt, 95:5): 0.39. **HPLC-MS** (ES, positivo) (gradiente 1): t_R = 10.20 min., m/z 248.2 [M(³⁵Cl³⁵Cl)+H]⁺, 250.3 [M(³⁵Cl³⁷Cl)+H]⁺, 252.2 [M(³⁷Cl³⁷Cl)+H]⁺. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.93 (t, J = 7.5 Hz, 3H, CH₃CH₂), 1.23 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CH₃CH), 1.60 (dq, J = 7.4, 6.4 Hz, 2H, CH₂), 4.30 (m, 1H, CH), 9.20 (sa, 1H, NH), 10.29 (s, 1H, CHO). **¹³C RMN** (100 MHz, CDCl₃) δ: 10.3 (CH₃), 20.1 (CH₃), 29.4 (CH), 48.9 (CH₂), 106.4 (C_{Ar}-CHO), 161.2, 162.8, 166.3 (3C_{Ar}), 190.7 (CHO).

- 4,6-Dicloro-2-(isobutilamino)pirimidina-5-carbaldehído y 2,6-dicloro-4-(isobutilamino)pirimidina-5-carbaldehído (3.32 y 3.34)



A una disolución de 2,4,6-tricloropirimidina-5-carbaldehído (1 g, 4.73 mmol) en DCM anhidro (20 mL), a -78 °C bajo atmósfera de argón, se añade lentamente una disolución de

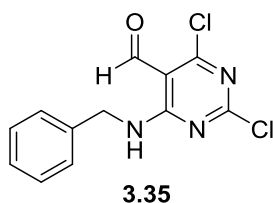
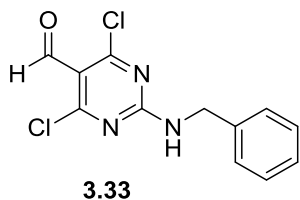
isobutilamina (0.42 mL, 4.29 mmol) y DIEA (8.6 mL) en DCM seco (8 mL), y se deja reaccionar a esa temperatura durante 3 horas. La mezcla de reacción se lava con agua (2 x 20 mL) y con una disolución de NaCl saturada (20 mL). La fase orgánica resultante se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora. El crudo resultante se purifica en un equipo de Biotage® (hexano:AcOEt, 9:1). De las fracciones de menor movilidad, se aislan 147 mg (14% de rendimiento) de un sólido amarillo que se identificó como **3.32** (producto minoritario).

TLC R_f (hexano:AcOEt, 95:5): 0.12. **HPLC-MS** (ES, positivo) (gradiente 1): t_R = 9.47 min., m/z 248.2 [M(³⁵Cl³⁵Cl)+H]⁺, 250.2 [M(³⁵Cl³⁷Cl)+H]⁺, 252.2 [M(³⁷Cl³⁷Cl)+H]⁺. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.95 (d, J = 6.7 Hz, 6H, 2CH₃), 1.90 (m, 1H, CH), 3.34 (dd, J = 6.2, 6.8 Hz, 2H, CH₂), 6.17 (sa, 1H, NH), 10.22 (s, 1H, CHO). **¹³C RMN** (100 MHz, CDCl₃) δ: 20.1 (2CH₃), 28.4 (CH), 49.3 (CH₂), 114.1 (C_{Ar}-CHO), 160.6, 163.7, 165.2 (3C_{Ar}), 185.1 (CHO).

De las fracciones de mayor movilidad se obtuvieron 820 mg (77% de rendimiento) de un aceite incoloro que se identificó como **3.34**.

TLC R_f (hexano/AcOEt, 95:5): 0.30. **HPLC-MS** (ES, positivo) (gradiente 1): t_R = 10.18 min., m/z 248.2 [M(³⁵Cl³⁵Cl)+H]⁺, 250.3 [M(³⁵Cl³⁷Cl)+H]⁺, 252.2 [M(³⁷Cl³⁷Cl)+H]⁺. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.98 (d, J = 6.7 Hz, 6H, 2CH₃), 1.94 (m, 1H, CH), 3.42 (dd, J = 6.8, 5.8 Hz, 2H, CH₂), 9.40 (sa, 1H, NH), 10.31 (s, 1H, CHO). **¹³C RMN** (100 MHz, CDCl₃) δ: 20.2 (2CH₃), 28.3 (CH), 48.8 (CH₂), 106.6 (C_{Ar}-CHO), 162.0, 162.9, 166.2 (3C_{Ar}), 190.8 (CHO).

- **2-(Bencilamino)-4,6-dicloropirimidina-5-carbaldehído y 4-(bencilamino)-2,6-dicloropirimidina-5-carbaldehído (3.33 y 3.35)**



A una disolución de 2,4,6-tricloropirimidina-5-carbaldehído (1 g, 4.73 mmol) en DCM anhidro (20 mL), a -78 °C bajo atmósfera de argón, se añade lentamente una

disolución de bencilamina (0.46 mL, 4.29 mmol) y DIEA (8.6 mL) en DCM seco (8 mL), y se mantiene a esa temperatura durante 3 horas. La mezcla de reacción se lava con agua (2 x 20 mL) y con una disolución de NaCl saturada (20 mL). La fase orgánica resultante se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora. El crudo resultante se purifica en un equipo de Biotage® (hexano:AcOEt, 9:1) obteniéndose, de las fracciones de menor movilidad 186 mg (15% de rendimiento) de un sólido amarillo que se identificó como **3.33**.

TLC R_f (hexano:AcOEt, 95:5): 0.18. **HPLC-MS** (ES, positivo) (gradiente 1): t_R = 9.43 min., m/z 282.2 [M(³⁵Cl³⁵Cl)+H]⁺, 284.2 [M(³⁵Cl³⁷Cl)+H]⁺, 286.3 [M(³⁷Cl³⁷Cl)+H]⁺. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ: 4.72 (d, J = 6.0 Hz, 2H, CH₂), 6.42 (sa, 1H, NH), 7.26-7.40 (m, 5H, Ar), 10.25 (s, 1H, CHO). **¹³C RMN** (100 MHz, CDCl₃) δ: 46.0 (CH₂), 114.6 (C_{Ar}-CHO), 127.9 (2CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 129.1 (2CH_{Ar}), 136.7 (C_{Ar}), 160.2, 163.9, 165.3 (3C_{Ar}), 185.0 (CHO).

De las fracciones de mayor movilidad se aíslan 833 mg (69% de rendimiento) de un sólido blanco que se identificó como **3.35**.

TLC R_f (hexano:AcOEt, 95:5): 0.34. **HPLC-MS** (ES, positivo) (gradiente 1): t_R = 9.98 min., m/z 282.3 [M(³⁵Cl³⁵Cl)+H]⁺, 284.2 [M(³⁵Cl³⁷Cl)+H]⁺, 286.1 [M(³⁷Cl³⁷Cl)+H]⁺. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃) δ: 4.78 (d, J = 5.7 Hz, 2H, CH₂), 7.28-7.40 (m, 5H, Ar), 9.60 (sa, 1H, NH), 10.31 (s, 1H, CHO). **¹³C RMN** (100 MHz, CDCl₃) δ: 45.4 (CH₂), 106.9 (C_{Ar}-CHO), 128.0 (2CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 129.1 (2CH_{Ar}), 136.5 (C_{Ar}), 161.7, 163.0, 166.3 (3C_{Ar}), 190.6 (CHO).

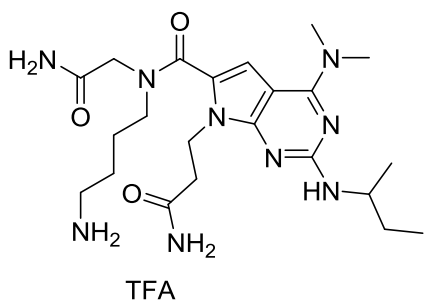
5.5.2. Síntesis de pirrolopirimidinas en fase sólida (3.01, 3.36-3.38)

Procedimiento general: (A) En primer lugar, se realiza la síntesis del peptóide **3.04**, empleando una resina MBHA de tipo Rink de carga 0.56 mmol/g (300 mg, 0.168 mmol), según el procedimiento general descrito para la síntesis de peptóides¹¹. Para

ello, se emplea una jeringa con filtro donde se hincha la resina (4 x 0.5 min. cada vez, DCM/DMF/DCM/DMF) antes de cada reacción. A continuación, se elimina el grupo protector temporal Fmoc añadiendo 3 volúmenes de una disolución al 20% de piperidina en DMF en volumen (1 x 1 min. y 3 x 10 min.). La resina se lava cuatro veces con cada disolvente a vacío (4 x 0.5 min. cada vez, DMF/DCM/DMF/DCM). A continuación, se prepara una disolución de ácido bromoacético (0.35 g, 2.52 mmol) y DIC (0.32 g, 2.52 mmol) en DMF anhidra (2 mL) y se deja reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Esta disolución se añade a la resina, previamente hinchada, y se deja reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Este proceso se repite dos veces. Después de lavar a vacío la resina e hincharla posteriormente, se hace reaccionar con *N*-Boc-1,4-butanodiamina (0.63 mL, 3.36 mmol) en DMF anhidra (2 mL) durante dos horas a temperatura ambiente. De nuevo, se hace reaccionar con ácido bromoacético y DIC en DMF anhidra (2 x 30 min.) y posteriormente se introduce el hidrocloreto de 3-aminopropanamida (0.42 g, 3.36 mmol) y TEA (0.93 mL, 6.72 mmol) en DMSO anhidro (3.4 mL) y se mantiene a temperatura ambiente durante dos horas agitando orbitálicamente. Una vez lavada la resina a vacío se obtuvo el peptoide **3.04**, que fue identificado por HPLC-MS, tras realizar un pequeño desanclaje de la resina poliestirénica (apartado 4.3.6).

(B) Una vez sintetizado el peptoide **3.04**, se completa la síntesis de las pirrolopirimidinas según se describe en la bibliografía.^{12,13} Se hincha la resina y se hace reaccionar con el correspondiente 2-alkil-4,6-(dicloro)pirimidina-5-carbaldehído (5 eq.) y TEA (82 µL, 0.588 mmol) disueltos en THF (4 mL) y se deja agitando orbitálicamente a temperatura ambiente durante la noche. Pasado ese tiempo se lava la resina y, a continuación, ésta se hincha de nuevo y se realiza una dimetilaminación con DIEA (0.57 mL, 3.36 mmol) y una disolución 2M de dimetilamina en THF (1.68 mL, 3.36 mmol) en NMP anhidra (2 mL), calentando en un tubo de presión durante la noche a 60 °C. A continuación, se añade 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) (0.3 mL, 3.36 mmol) en DMF anhidra (3 mL) y se calienta en un tubo de presión a 90 °C durante la noche. Finalmente, se realiza el desanclaje de la resina poliestirénica por tratamiento acidolítico con TFA:TIPS:H₂O 95:2.5:2.5 durante 4 horas a temperatura ambiente. El crudo final se purifica por cromatografía de media presión (HPFC) en fase reversa en el Biotage® (0% inicial de A hasta 100% final de A) o mediante HPLC semipreparativo.

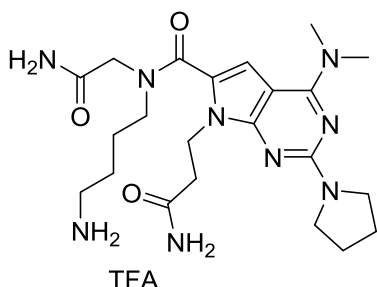
- ***N*-(4-Aminobutil)-2-(*sec*-butilamino)-7-(2-carbamoiletil)-*N*-carbamoilmetil-4-dimetilamino-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina-6-carboxamida TFA (3.01)**



Seguendo el procedimiento general el peptoido **3.04** se hace reaccionar con 2-(*sec*-butilamino)-4,6-dicloropirimidina-5-carbaldehído (135 mg, 0.588 mmol) y TEA en THF (4 mL), obteniéndose 18 mg (22% de rendimiento) de un sólido amorfo amarillo que se identificó como **3.01**, tras purificación.

HPLC-analítico (gradiente 4): t_R = 5.58 min. (>91% pureza). **^1H RMN** (400 MHz, DMSO, 90°C) δ : 0.90 (t, J = 7.4 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.16 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CHCH_3), 1.43-1.53 (m, 2H, CH_2CH_3), 1.54-1.73 (m, 4H, $\text{NH}_3^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.53-2.59 (m, 2H, CH_2CONH_2), 2.84 (t, J = 7.2 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCO}$), 3.23 (s, 6H, $2\text{CH}_3\text{N}$), 3.47 (t, J = 7.1 Hz, 2H, CH_2NH_3^+), 3.93 (q, J = 6.5 Hz, 1H, CH), 4.09 (s, 2H, COCH_2N), 4.30 (t, J = 7.5 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{N}_{\text{pir}}$), 5.78 (sa, 1H, NH), 6.71 (s, 1H, Ar), 7.06 (sa, 4H, 2CONH_2), 7.68 (sa, 3H, NH_3^+). **^{13}C RMN** (125 MHz, DMSO, rt) δ : 10.9 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2$), 20.3 ($\text{CH}_3\text{-CH}$), 24.5 ($\text{NH}_3^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 29.1 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 34.9 (CH_2CONH_2), 38.6 ($2\text{CH}_3\text{N}$), 38.7 ($2\text{CH}_2\text{N}_{\text{pir}}$), 38.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCO}$), 45.9 (CH_2NH_3^+), 47.7 (CH-NH), 51.9 (COCH_2N), 94.8 (C_{Ar}), 104.9 (CH_{Ar}), 117.3 (q, J = 300 Hz, CF_3COO^-), 123.9 (C_{Ar}), 157.6 (2C), 158.1 (q, J = 31 Hz, CF_3COO^-), 164.1 (2C), 172.3 (2CONH_2). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para $\text{C}_{22}\text{H}_{37}\text{N}_9\text{O}_3$ 475.3019; encontrada 475.3018 (-0.16 ppm). **Análisis elemental (%)** calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{37}\text{N}_9\text{O}_3 \cdot 1.5 \text{ TFA} \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$: C, 43.99; H, 6.28; N, 18.47. Encontrado: C, 44.24; H, 6.27; N, 18.65.

- ***N*-(4-Aminobutil)-7-(2-carbamoiletil)-*N*-carbamoilmetil-4-dimetilamino-2-(pirrolidin-1-il)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina-6-carboxamida TFA (3.36)**

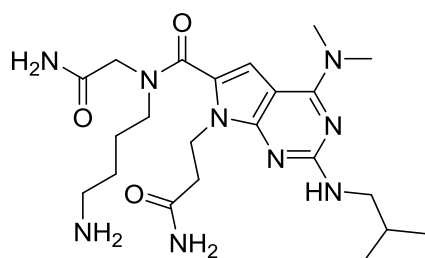


Según el procedimiento general el peptoido **3.04** se hizo reaccionar con 4,6-dicloro-2-(pirrolidin-1-il)pirimidina-5-carbaldehído (207 mg, 0.84 mmol) y TEA en THF (4 mL) durante la noche a temperatura ambiente. El producto resultante, tras ciclación, desanclaje y purificación condujo a **3.36** (45 mg, 57% de rendimiento) como un sólido amorfo amarillo.

HPLC-analítico (gradiente 5): t_R = 3.87 min. (>99% pureza). **^1H RMN** (400 MHz, DMSO, 90°C) δ : 1.46-1.82 (m, 4H, $\text{NH}_3^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.85-1.97 (m, 4H, 2CH_2 (pirrolidina)), 2.59 (t, J = 7.2 Hz, 2H, CH_2CONH_2), 2.84 (t, J = 7.2 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCO}$), 3.25 (s, 6H,

2CH₃N), 3.48 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH₂NH₃⁺), 3.50-3.57 (m, 4H, 2CH₂(pirrolidina)N), 4.09 (s, 2H, COCH₂NCO), 4.33 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂N_{pir}), 6.73 (s, 1H, Ar), 7.06 (sa, 4H, 2CONH₂), 7.71 (sa, 3H, NH₃⁺). ¹³C RMN (101 MHz, DMSO, rt) δ: 24.5 (NH₃⁺CH₂CH₂CH₂), 25.0 (2CH₂(pirrolidina)), 34.8 (CH₂CONH₂), 38.5 (2CH₃N), 38.6 (CH₂N_{pir}), 38.9 (CH₂CH₂NCO), 46.3 (2CH₂(pirrolidina)N), 94.5 (C_{Ar}), 104.3 (CH_{Ar}), 117.1 (q, $J = 301$ Hz, CF₃COO⁻), 124.2 (C_{Ar}), 157.4 (2C), 158.1 (q, $J = 32$ Hz, CF₃COO⁻), 164.0 (2C), 172.8 (2CONH₂). HRMS (ESI positivo, m/z): calculada para C₂₂H₃₅N₉O₃ 473.2863; encontrada 473.2869 (1.33 ppm).

- ***N*-(4-Aminobutil)-7-(2-carbamoiletil)-*N*-carbamoilmetil-4-dimetilamino-2-isobutilamino-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina-6-carboxamida TFA (3.37)**

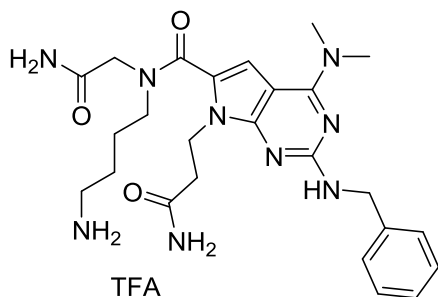


TFA

Siguiendo el procedimiento general, se hizo reaccionar **3.04** con 4,6-dicloro-2-(isobutilamino)pirimidina-5-carbaldehído (146 mg, 0.588 mmol) y TEA en THF (4 mL), para dar 18 mg (22% de rendimiento) de un sólido amorfo de color amarillo que se identificó como **3.37**.

HPLC-analítico (gradiente 4): $t_R = 5.63$ min. (>93% pureza). ¹H RMN (400 MHz, DMSO, 90°C) δ: 0.89 (d, $J = 6.7$ Hz, 6H, 2CH₃), 1.45-1.75 (m, 4H, NH₃⁺CH₂CH₂CH₂), 1.89 (hept, $J = 6.7$ Hz, 1H, CH), 2.53 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH₂CONH₂), 2.82 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂CH₂NCO), 3.14 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H, CHCH₂NH), 3.22 (s, 6H, 2CH₃N), 3.44 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂NH₃⁺), 4.06 (s, 2H, COCH₂N), 4.28 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH₂-CH₂N_{pir}), 6.70 (s, 1H, Ar), 7.10 (sa, 4H, 2CONH₂), 7.68 (sa, 3H, NH₃⁺). ¹³C RMN (125 MHz, DMSO, rt) δ: 20.8 (2CH₃), 24.5 (NH₃⁺CH₂CH₂CH₂), 28.1 (CH), 34.8 (CH₂CONH₂), 38.9 (CH₂-CH₂-N_{pir}), 39.0 (2CH₃), 39.1 (CH₂CH₂NCO), 46.3 (CH₂NH₃⁺), 49.1 (CHCH₂NH), 51.9 (COCH₂N), 94.7 (C_{Ar}), 105.1 (CH_{Ar}), 117.2 (q, $J = 300$ Hz, CF₃COO⁻), 124.2 (C_{Ar}), 157.8 (2C), 158.2 (q, $J = 31$ Hz, CF₃COO⁻), 164.0 (2C), 172.3 (2CONH₂). HRMS (ESI positivo, m/z): calculada para C₂₂H₃₇N₉O₃ 475.3019; encontrada 475.3013 (-1.37 ppm). **Análisis elemental (%)** calculado para C₂₂H₃₇N₉O₃ · 1.5 TFA · 2 H₂O: C, 43.99; H, 6.28; N, 18.47. Encontrado: C, 44.12; H, 6.31; N, 18.30.

- ***N*-(4-Aminobutil)-2-bencilamino-7-(2-carbamoiletil)-*N*-carbamoilmetil-4-dimetilamino-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina-6-carboxamida TFA (3.38)**

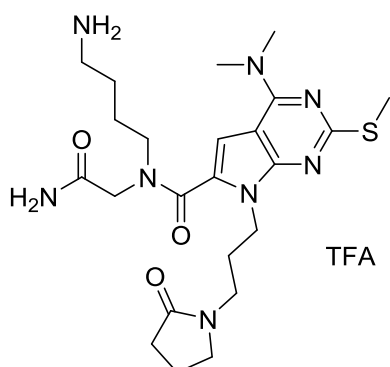


Siguiendo el procedimiento general, el peptido **3.04** se hace reaccionar con 2-(bencilamino)-4,6-dicloropirimidina-5-carbaldehído (166 mg, 0.588 mmol) y TEA en THF (4 mL) durante toda la noche a temperatura ambiente. Tras ciclación, desanclaje, purificación y secado condujo a **3.38** (18 mg, 21% de rendimiento) como un sólido amorfo amarillo.

HPLC-analítico (gradiente 4): t_R = 5.88 min. (>95% pureza). **1H RMN** (400 MHz, DMSO, 90°C) δ : 1.33-1.73 (m, 4H, $NH_3^+CH_2CH_2CH_2$), 2.54 (t, J = 7.6, 2H, CH_2CONH_2), 2.78 (t, J = 7.2 Hz, 2H, CH_2CH_2NCO), 3.20 (s, 6H, $2CH_3N$), 3.46 (t, J = 7.2 Hz, 2H, $CH_2NH_3^+$), 4.08 (s, 2H, $COCH_2N$), 4.30 (t, J = 7.5 Hz, 2H, CH_2N_{pir}), 4.50 (d, J = 6.1 Hz, 2H, CH_2NH), 6.59 (t, J = 6.3 Hz, 1H, NH), 6.69 (s, 1H, $CH_{Ar(pirrol)}$), 7.18 (t, J = 7.3 Hz, 1H, Ar), 7.27 (t, J = 7.5 Hz, 2H, Ar), 7.38 (d, J = 7.5 Hz, 2H, Ar), 8.29 (sa, 3H, NH_3^+). **^{13}C RMN** (125 MHz, DMSO, rt) δ : 24.7 ($NH_3^+CH_2CH_2CH_2$), 34.9 (CH_2CONH_2), 38.5 ($2CH_3N$), 38.6 (CH_2N_{pir}), 38.7 (CH_2CH_2NCO), 44.6 ($CH_2NH_3^+$), 45.8 (CH_2NH), 51.9 ($COCH_2N$), 95.1 (C_{Ar}), 104.7 (CH_{Ar}), 117.3 (q, J = 300 Hz, CF_3COO^-), 123.9 (C_{Ar}), 126.3 ($2CH_{benc.}$), 127.6 ($CH_{benc.}$), 128.0 ($2CH_{benc.}$), 141.7 ($C_{benc.}$), 157.8 (C), 158.0 (q, J = 31 Hz, CF_3COO^-), 159.0 (C), 164.2 (2C), 172.4 ($2CONH_2$). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para $C_{25}H_{35}N_9O_3$ 509.2863; encontrada 509.2864 (0.17 ppm). **Análisis elemental (%)** calculado para $C_{25}H_{35}N_9O_3 \cdot 1.2$ TFA \cdot 2.6 H_2O : C, 47.47; H, 6.02; N, 18.18. Encontrado: C, 47.04; H, 6.05; N, 18.61.

5.5.3. Síntesis en fase sólida de 2-metiltio- y 2-metilsulfonil-pirrolopirimidinas intermedias 3.14 y 3.22

- ***N*-(4-Aminobutil)-*N*-carbamoilmetil-4-dimetilamino-2-metiltio-7-(3-(2-oxopirrolidin-1-il)propil)-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina-6-carboxamida TFA (3.14)**

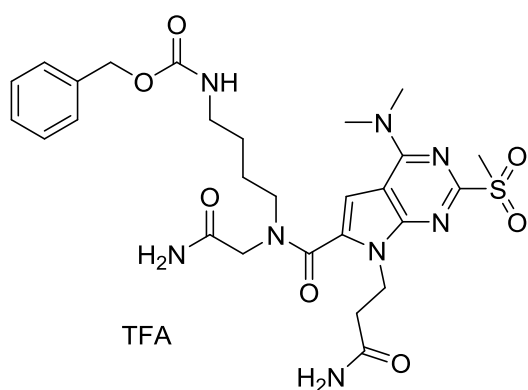


Se hincha la resina (100 mg, 0.056 mmol), se elimina el grupo Fmoc y se lava la resina según los protocolos generales descritos anteriormente. Una disolución de ácido bromoacético 2M y de DIC 2M en DMF anhidra

se deja reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Esta disolución se añade a la resina, previamente hinchada, y se mantiene durante 2 horas a temperatura ambiente. Se repite este proceso dos veces y a continuación, se lava la resina a vacío. Seguidamente, se trata la resina con una disolución de *N*-Boc-1,4-butanodiamina (0.21 mL, 1.12 mmol) en DMF anhidra (1.13 mL) durante dos horas a temperatura ambiente. Se trata con una disolución 2M de ácido bromoacético en DMF y con una disolución 2M de DIC en DMF durante 10 min. y se añade una disolución de *N*-(3-aminopropil)-2-pirrolidinona (0.157 mL, 1.12 mmol) en DMSO (1.13 mL). La mezcla de reacción se mantiene durante dos horas a temperatura ambiente, según el protocolo descrito para la síntesis de peptoides. Una vez formado el peptoide **3.11**, éste se hace reaccionar con 4,6-dicloro-2-(metiltio)pirimidina-5-carbaldehído (63 mg, 0.28 mmol) y TEA (0.040 mL, 0.28 mmol) en THF anhidro a temperatura ambiente durante la noche. Sobre el producto resultante se añade DIEA (0.19 mL, 1.12 mmol) y una disolución 2M de dimetilamina en THF (0.56 mL, 1.12 mmol) en NMP (0.5 mL) y se calienta en un tubo de presión durante toda la noche a 60 °C. Seguidamente, se realiza la ciclación empleando DBU (0.17 mL, 1.12 mmol) en DMF (2 mL) calentando en un tubo de presión a 90 °C durante toda la noche, y por último, se trata con TFA:TIPS:H₂O 95:2.5:2.5 durante 4 horas a temperatura ambiente. Tras la purificación mediante HPLC-semipreparativo (gradiente: 5% inicial de CH₃CN, gradiente lineal de 30 minutos hasta 20% de CH₃CN) se obtuvieron 2.69 mg (10% de rendimiento) de un sólido blanco algodonoso que se identificó como **3.14**.

HPLC-analítico (gradiente 1): t_R = 6.62 min. (>97% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para C₂₃H₃₆N₈O₃S 504.2631; encontrada 504.2630 (-0.19 ppm).

- ***N*-(4-(*N*-Benciloxycarbonil)aminobutil)-7-(2-carbamoiletil)-*N*-(carbamoilmetil)-4-dimetilamino-2-metilsulfonil-7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidina-6-carboxamida TFA (**3.23**)**



Siguiendo un procedimiento similar al descrito para la síntesis de **3.14**, la resina (1 g, 0.56 mmol), previamente hinchada, se hizo reaccionar primero con hidrócloruro de bencil *N*-(4-aminobutil)carbamato (724 mg, 2.8 mmol) y TEA (0.78 mL, 5.6 mmol) en DMSO anhidro (2.8 mL) durante dos horas a temperatura ambiente; y seguidamente, con

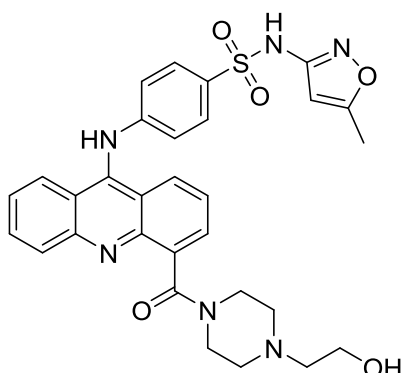
hidrócloruro de 3-aminopropanamida (1.40 g, 11.2 mmol) y TEA (3.1 mL, 22.4 mmol)

en DMSO (11.3 mL) durante dos horas a temperatura ambiente, para formar el peptoido **3.18**. El peptoido, se trata con 4,6-dicloro-2-(metiltio)pirimidina-5-carbaldehído (465 mg, 2.6 mmol), empleando TEA (0.312 mL, 2.24 mmol) como base en THF anhidro a temperatura ambiente durante toda la noche, seguido de la reacción con DIEA (1.92 mL, 11.2 mmol) y una disolución 2M de dimetilamina en THF (5.6 mL, 11.2 mmol) en NMP (5mL) y se deja calentando en un tubo de presión durante toda la noche a 60 °C. Seguidamente, se añade DBU (1.68 mL, 11.2 mmol) en DMF (20 mL) y se calienta en un tubo de presión a 90 °C durante la noche. Posteriormente, se añade mCPBA (966 mg, 5.6 mmol) y NaHCO₃ (706 mg, 8.4 mmol) en THF (20 mL) y H₂O (4 mL), y se agita durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras el desanclaje de la resina empleando TFA:TIPS:H₂O 95:2.5:2.5 y la posterior purificación en un equipo de Biotage®, se obtuvieron 12.9 mg (10% de rendimiento) de un sólido blanco de aspecto algodonoso que se identifica como **3.23**.

HPLC-analítico (gradiente 1): t_R = 6.09 min. (>90% pureza). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para C₂₇H₃₆N₈O₇S 616.2428; encontrada 616.2399 (-4.58 ppm).

5.6. Síntesis en disolución de los compuestos resultantes del cribado virtual

- 4-[[4-[[4-(2-Hidroxietil)-1-piperazinil]carbonil]-9-acridinil]amino]-N-(5-metil-3-isoxazolil)bencenosulfonamida (**3.43**)¹⁴

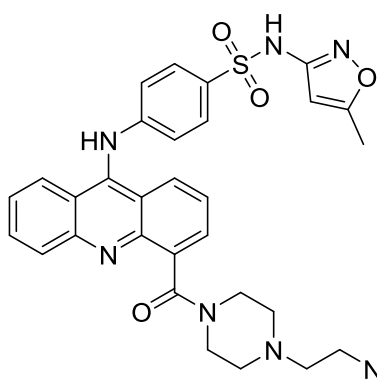


Sobre una disolución de 4-carboxi-9-acridanona comercial (200 mg, 0.84 mmol) en DMF anhidra (5 gotas) a temperatura ambiente, se añade SOCl₂ (1.6 mL) y la mezcla de reacción se calienta a reflujo durante una hora bajo atmósfera de argón. Se coevapora con tolueno (2 x 2 mL). Sobre el cloruro de ácido así formado se añade, a -5 °C, una disolución de 1-(2-hidroxietil)piperazina (435 mg, 3.34 mmol) en DCM anhidro (2 mL) y se calienta la mezcla de reacción a 30 °C durante 30 min. A continuación, se lava con una disolución de Na₂CO₃ al 10% (2 x 20 mL) y con una disolución de NaCl (2 x 20 mL). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro y se evapora a sequedad, obteniéndose 307 mg del cloruro intermedio **3.60** [HPLC-MS: m/z 370 (M+1)⁺, con distribución isotópica de cloro], que no se aísla y se utiliza en el siguiente paso de reacción sin purificación previa. El cloruro intermedio, se trata con fenol (0.780 mg, 8.30 mmol) y sulfametoxazol (210 mg, 0.83 mmol) en una mezcla de

CHCl₃/EtOH (1:3), calentando a 115°C durante tres días.¹⁵ Se lava con MeOH y tolueno y se evapora a sequedad a presión reducida. El residuo se liofiliza y se purifica por cromatografía flash en columna de gel de sílice (DCM:MeOH, 10:1) y se repurifica mediante cromatografía circular centrífuga (CCTLC) en el cromatotrón (DCM:MeOH, 20:1), obteniéndose 255 mg de **3.43** (32% de rendimiento) como un sólido anaranjado. Sus datos analíticos y espectroscópicos coinciden con los datos descritos en la literatura.¹⁴

Pf¹¹: 181-183 °C (DMF:H₂O). **Pf**: 178-180 °C. **HPLC-analítico** (gradiente 2): t_R = 5.17 min. (92% pureza). **¹H RMN** (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 2.24 (s, 3H, CH₃), 2.34-2.44 (m, 4H, 2CH₂-N_{pip.}), 2.62 (m, 2H, CH₂-N_{pip.}), 3.04 (q, J = 11.2, 8.2 Hz, 2H, CH₂-OH), 3.46-3.69 (m, 4H, 2CH₂-N_{pip.}-CO), 3.93 (sa, 1H, OH), 6.07 (s, 1H, CH_{vinílico}), 6.78 (d, J = 8.0 Hz, 2H, Ar), 7.49-7.56 (m, 2H, Ar), 7.59 (d, J = 8.7 Hz, 2H, Ar), 7.70 (d, J = 8.0 Hz, 1H, Ar), 7.81-7.86 (m, 1H, Ar), 8.03-8.13 (m, 3H, Ar), 9.76 (s, 1H, NH-SO₂), 10.18 (sa, 1H, Ar-NH-Ar).

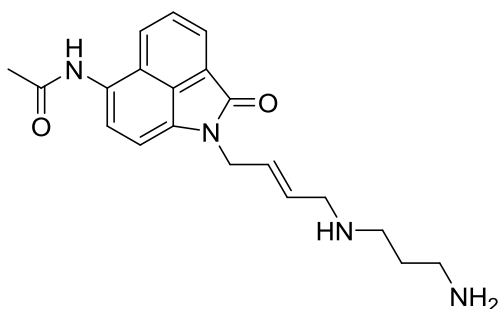
- 4-[[4-[[4-(2-Aminoetil)-1-piperazinil]carbonil]-9-acridinil]amino]-N-(5-metil-3-isoxazolil)bencenosulfonamida (**3.44**)



El intermedio Boc-protégido **3.64** (32 mg, 0.05 mmol) se hace reaccionar con una disolución de HCl 1.25 M en MeOH (56 µL) a temperatura ambiente durante 4 h¹⁶. El sólido obtenido se filtra y se lava con MeOH y Et₂O frío varias veces, obteniéndose 6.3 mg (23% de rendimiento) del compuesto **3.44**, como un sólido rojizo.

Pf: 203-205 °C. **HPLC-analítico** (gradiente 2): t_R = 5.17 min. (92% pureza). **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 2.30 (s, 3H, CH₃-C=CH), 2.37-2.50 (m, 8H, 4CH₂), 3.35-3.42 (m, 4H, 2CH₂), 4.79 (sa, 2H, CH₂-NH₂), 6.14 (s, 1H, CH_{vinílico}), 7.09-8.31 (m, 11H, Ar), 9.78 (s, 1H, NH-SO₂), 11.29 (Ar-NH-Ar). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para C₃₀H₃₁N₇O₄S 585.2158; encontrada 585.2151 (-1.27 ppm).

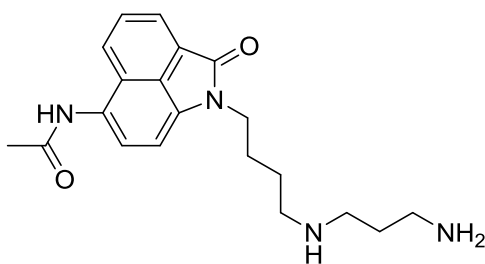
• **(E)-6-Acetamido-1-(4-((3-aminopropil)amino)-clorobut-2-enil)benzo[cd]indol-2-(1H)-ona (3.45)**



A una disolución de **3.68** (46 mg, 0.15 mmol) en MeOH (5mL) se añade 1,3-diaminopropano (244 μ L, 2.92 mmol) y se calienta a 55 $^{\circ}$ C durante 7 h. El crudo obtenido (193 mg), tras evaporar el disolvente a presión reducida, se purifica por cromatografía flash en columna de gel de sílice utilizando como eluyentes DCM y una disolución 7N de NH_3 en MeOH en una proporción 5:1. Se obtienen 58 mg (54% de rendimiento) de **3.45** como un aceite amarillo.

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 1.41 (q, $J = 7.3, 6.8$ Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{NH}_2$), 2.18 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CONH}$), 2.43 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, CH_2), 2.53 (m, 2H, CH_2), 3.08 (s, 2H, $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_{\text{vinílico}}$), 4.48 (d, $J = 2.6$ Hz, 2H, $\text{CON-CH}_2\text{-CH}_{\text{vinílico}}$), 5.68 (t, 2H, $2\text{CH}_{\text{vinílicos}}$), 7.08 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, Ar), 7.94-7.63 (m, 2H, Ar), 8.08 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H, Ar), 8.34 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, Ar), 10.01 (s, 1H, NHAc). $^{13}\text{C RMN}$ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 24.2 (CH_3), 32.9 ($\text{HNCH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{NH}_2$), 39.9 (CH_2), 41.6 (CH_2), 47.1 (CH_2), 51.0 (CH_2), 125.5, 132.8 (CH=CH), 106.9, 122.4, 124.7, 124.9, 125.1, 126.6, 128.6, 129.0, 129.8, 136.0, (Ar), 167.1, 169.6 (CO). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_2$ 352.1899; encontrada 352.1907 (2.34 ppm).

• **6-Acetamido-1-(4-((3-aminopropil)amino)-butan-1-il)benzo[cd]indol-2-(1H)-ona (3.46)**

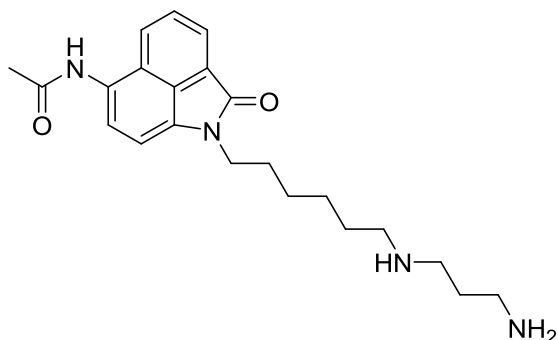


Una disolución de **3.45** (30 mg, 0.09 mmol) en una mezcla THF:MeOH (1:1, 10 mL) se hidrogena con globo en presencia de Pd/C al 5% a 30 $^{\circ}$ C durante toda la noche. Se filtra el catalizador, se lava con MeOH y se evapora a sequedad. El residuo se purifica por CCTLC en el cromatotrón empleando como eluyentes DCM y una disolución 7N de NH_3 en MeOH en una proporción 5:1, para dar **3.46** (8.4 mg, 28% de rendimiento) como un aceite amarillo.

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 1.20 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 1.55-1.77 (m, 4H, $2(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2)$), 2.15 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CONH}$), 2.47 (2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 2.64-2.94 (m, 4H, $2\text{CH}_2\text{-NH}$), 3.89 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-NCO}$), 7.16 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar), 7.74 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, Ar), 7.80 (dd, $J = 6.9, 8.3$ Hz, 1H, Ar), 8.04 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar), 8.32 (d, $J = 8.3$ Hz,

1H, Ar), 10.02 (s, 1H, NHAc). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para C₂₀H₂₆N₄O₂ 354.2056; encontrada 354.2058 (0.75 ppm).

- **6-Acetamido-1-(6-((3-aminopropil)amino)hexan-1-il)benzo[cd]indol-2(1H)-ona (3.47)**

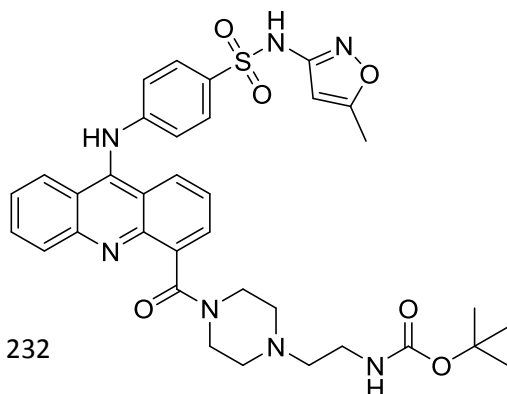


Una disolución del bromo derivado **3.69** (25 mg, 0.06 mmol) en MeOH (5 mL) se calienta y a 55 °C se añade 1,3-diaminopropano (107 µL, 1.28 mmol). La mezcla de reacción se mantiene con agitación a esa temperatura durante la noche. Se evapora a sequedad y el residuo se coevapora varias veces con

tolueno para eliminar el exceso de amina. Se purifica mediante CCTLC en el cromatotrón empleando como eluyente DCM y una disolución 7N de NH₃ en MeOH en una proporción 5:1, aislándose 19 mg (78% de rendimiento) de **3.47** como un aceite amarillo.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.20-1.40 (m, 6H, 3CH₂), 1.43-1.50 (sa, 2H, NH₂-CH₂), 1.67-1.77 (m, 4H, 2CH₂), 1.89 (s, 1H, CH₂-NH-CH₂), 2.18 (s, 3H, CH₃-CONH), 2.64 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂-NH), 2.75 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂-NH), 2.83 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂-NH), 3.90 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH₂-NCO), 7.16 (d *J* = 7.7 Hz, 1H, Ar), 7.77 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar), 7.82 (dd, *J* = 8.2, 7.0 Hz, 1H, Ar), 8.06 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, Ar), 8.35 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 10.00 (s, 1H, NH). **¹³C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 24.1 (CH₃-CONH), 25.9 (CH₂), 26.6 (CH₂), 26.7 (CH₂), 27.6 (CH₂), 28.7 (CH₂), 37.8 (CH₂-NH), 40.1 (CH₂-NCO), 45.7 (CH₂-NH), 48.2 (CH₂-NH), 106.6, 122.5, 124.7, 124.9, 125.0, 126.7, 128.5, 129.1, 129.8, 136.3 (Ar), 167.5, 169.6 (CO). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para C₂₂H₃₀N₄O₂ 382.2369; encontrada 382.2384 (3.89 ppm).

- **4-[[4-[[4-(2-*N*-Boc-Aminoetil)-1-piperazinil]carbonil]-9-acridinil]amino]-*N*-(5-metil-3-isoxazolil)bencenosulfonamida (3.64)**

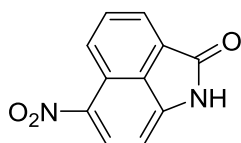


Siguiendo un procedimiento análogo al descrito para la síntesis del compuesto **3.43**, a partir de 1-(2-*N*-Boc-aminoetil)piperazina (767 mg, 3.34 mmol), se obtienen 829 mg del intermedio clorado **3.63** [HPLC-MS: m/z 469 (M+1)⁺, con distribución isotópica de cloro],

que se trata con fenol (1.660 g, 17.66 mmol) y sulfametoxazol (0.448 mg, 1.77 mmol) a 115°C durante tres días. Este tratamiento, similar al descrito para **3.43**, condujo tras purificación cromatográfica (DCM:MeOH, 10:1) y repurificación en el cromatotrón (DCM:MeOH, 20:1), a **3.64** (135 mg, 11% de rendimiento) como un sólido amarillo.

Pf: 125-127 °C. **HPLC-analítico** (gradiente 2): t_R = 6.38 min. (98% pureza). **¹H RMN** (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.37 (s, 9H, 3CH₃), 2.29 (s, 3H, CH₃-C=CH), 2.31-2.60 (m, 8H, 4CH₂-N_{pip.}), 2.98-3.03 (m, 2H, CH₂-NHCO), 3.08-3.11 (m, 2H, CH₂-CH₂-N_{pip.}), 6.13 (s, 1H, CH_{vinílico}), 6.82 (d, J = 8.8 Hz, 2H, Ar), 6.86-7.74 (m, 6H, Ar), 7.95-7.81 (m, 1H, NH-CO), 8.07-8.16 (m, 3H, Ar), 9.78 (s, 1H, NH-SO₂), 10.20 (Ar-NH-Ar). **¹³C RMN** (100 MHz, DMSO) δ : 12.7 (3CH₃), 28.9 (CH₃-C=CH), 37.8 (CH₂-NHCO), 41.9 (CH₂-N_{pip.}), 47.3 (CH₂-CH₂-N_{pip.}), 53.2 (CH₂-N_{pip.}), 53.4 (CH₂-N_{pip.}), 58.1 (CH₂-N_{pip.}), 78.2 (C(CH₃)₃), 96.1 (CH_{vinílico}), 115.3, 119.0, 121.9, 122.3, 124.8, 125.5, 125.7, 126.6, 128.8, 129.3, 129.7, 129.7, 130.5, 131.6, 137.7, 143.4, 146.5, 149.8, 151.0 (Ar), 156.2 (NH-CO-O), 158.6 (CH_{vinílico}-C-NHSO₂), 168.2 (CH_{vinílico}=C(CH₃)), 170.7 (CO-N_{pip.}). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para C₃₅H₃₉N₇O₆S 685.2683; encontrada 685.2670 (-1.82 ppm).

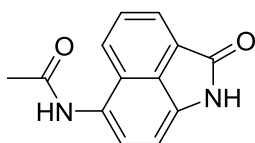
• **6-Nitrobenzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona (3.66)**¹⁷



Sobre una disolución de benz[*cd*]indol-2(1*H*)-ona (2.5 g, 15 mmol) en ácido acético glacial (11.25 mL) se añade, gota a gota, ácido nítrico al 65% (1.24 mL) y se agita a temperatura ambiente durante 1 h. (a lo largo de ese tiempo la disolución cambia de color marrón a verde, con un aspecto muy pastoso). A continuación, la mezcla de reacción se calienta a 50 °C durante 2 h., se filtra y el precipitado se lava con una mezcla de AcOH:H₂O, 1:1 (100 mL). El sólido obtenido se recrystaliza en MeOH, obteniéndose **3.66** (1.41 g, 44% de rendimiento) como un sólido marrón, cuyos datos analíticos y espectroscópicos coinciden con los datos descritos en la literatura.¹⁷

Pf¹⁴: 297-298 °C (MeOH). **Pf**: 289-291 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.11 (d, J = 8.1 Hz, 1H, Ar), 8.05 (dd, J = 8.2, 7.1 Hz, 1H, Ar), 8.16 (d, J = 6.9 Hz, 1H, Ar), 8.62 (d, J = 8.1 Hz, 1H, Ar), 8.87 (d, J = 8.3 Hz, 1H, Ar), 11.5 (s, 1H, NH).

• **6-Acetamidobenzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona (3.67)**¹⁸

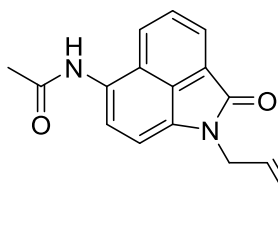


Sobre una disolución de 6-nitrobenzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona (1.20 g, 5.59 mmol) en THF (90 mL) se añade Pd/C al 5% y se hidrogena, con globo, manteniendo la temperatura a 30 °C

durante la noche. Se filtra el catalizador, se lava con THF y H₂O y se evapora a sequedad. Seguidamente, el amino intermedio se acetila con anhídrido acético (6.32 mL) y ácido acético glacial (18 mL), y se calienta a reflujo durante 1 h. Se evapora a presión reducida y el residuo se coevapora 2 veces con MeOH. El crudo obtenido (1.33 g) se purifica por cromatografía de gel flash en columna (DCM:MeOH, 20:1), para dar **3.67** (450 mg, 36% de rendimiento) como un sólido amarillo. Sus datos analíticos y espectroscópicos coinciden con los descritos en la literatura.¹⁸

Pf¹⁵: 260-262 °C (DCM:MeOH). **Pf**: 266-268 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.17 (s, 3H, CH₃-CONH), 6.94 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, Ar), 7.72 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, Ar), 7.81 (dd, *J* = 8.2, 7.0 Hz, 1H, Ar), 8.02 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, Ar), 8.31 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar), 9.96 (s, 1H, NHAc), 10.72 (s, 1H, NH).

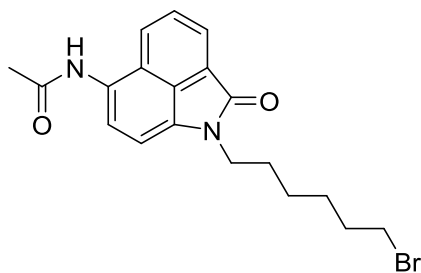
- **(*E*)-6-Acetamido-1-(4-clorobut-2-enil)benzo[*cd*]indol-2-(1*H*)-ona (3.68)**



A una disolución de 6-Acetamidobenzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona (170 mg, 0.75 mmol) en DMF anhidra (4.69 mL) se añade lentamente CH₃ONa (41 mg, 0.75 mmol), recientemente preparado, y se agita a temperatura ambiente durante 15 min. A continuación, se añade *trans*-1,4-dicloro-2-buteno (277 µL, 2.63 mmol) y se mantiene la agitación durante otros 30 min. a temperatura ambiente. Se elimina la DMF a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía flash en columna (DCM:MeOH, 10:1), obteniéndose 103 mg (50% de rendimiento) de un sólido amarillo que se identifica como **3.68**.

Pf: 211-213 °C. **¹H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.15 (s, 3H, CH₃-CONH), 4.16 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂), 4.51 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H, CH₂), 5.79 (td, *J* = 8.0, 14 Hz, 1H, CH_{vinílico}), 5.94 (td, *J* = 8, 14 Hz, 1H, CH_{vinílico}), 7.06 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, Ar), 7.74 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, Ar), 7.84 (dd, *J* = 8.0, 7.7 Hz, 1H, Ar), 8.06 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, Ar), 8.32 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar), 9.99 (s, 1H, NHAc). **¹³C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 24.2 (CH₃), 41.1 (CH₂), 45.1 (CH₂), 129.0, 130.4 (CH=CH), 107.0, 122.4, 124.6, 125.1, 126.5, 128.6, 129.1, 129.1, 130.0, 135.8 (Ar), 167.2, 169.6 (CO). **HRMS** (ESI positivo, *m/z*): calculada para C₁₇H₁₅N₂O₂Cl 314.0822; encontrada 314.0814 (-2.42 ppm).

- **6-Acetamido-1-(6-bromohexan-1-il)benzo[*cd*]indol-2-(1*H*)-ona (3.69)**



Sobre una disolución de **3.67** (123 mg, 0.54 mmol) en DMF anhidra (3.38 mL) se añade lentamente CH_3ONa (29 mg, 0.54 mmol), recientemente preparado, y se agita a temperatura ambiente durante 15 min. Seguidamente, se añade 1,6-dibromohexano (291 μL , 1.89 mmol) y se calienta a 90 °C durante 48 horas. El crudo obtenido se purifica por cromatografía flash en columna de gel de sílice ($\text{AcOEt}:\text{MeOH}$, 50:1), obteniéndose 44.3 mg (21% de rendimiento) de un sólido amarillo que se identificó como **3.69**.

Pf: 130-132 °C. **^1H RMN** (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 1.24-1.46 (m, 4H, 2CH_2), 1.56-1.77 (m, 4H, 2CH_2), 2.18 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CONH}$), 3.60 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Br}$), 3.87 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-NCO}$), 7.16 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, Ar), 7.77 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar), 7.82 (dd, $J = 8.3, 7.0$ Hz, 1H, Ar), 8.06 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, Ar), 8.33 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, Ar), 10.00 (s, 1H, NHAc). **HRMS** (ESI positivo, m/z): calculada para $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2\text{Br}$ 388.0786; encontrada 388.0484 (4.42 ppm), con distribución isotópica de bromo.

5.7. Métodos computacionales

Todos los cálculos se realizaron en el laboratorio del Prof. Federico Gago (Universidad de Alcalá) utilizando el clúster de cálculo Medusa (Centro de Biología Molecular UAM-CSIC) y Trueno (CSIC). Todos los programas empleados se obtuvieron mediante una licencia académica o del CSIC.

5.7.1. Métodos de simulación de dinámica molecular

Preparación de los sistemas teóricos

Los distintos sistemas teóricos fueron preparados usando la herramienta *tLeAP* de AmberTools14 (AMBER 14.0)¹⁹. Para construir el monómero de la TryR, se partió de la estructura cristalina de la enzima en su forma reducida determinada por difracción de rayos X (código 2JK6)²⁰ depositada en la base de datos *Protein Data Bank* (PDB)²¹. En los distintos sistemas inhibidor-monómero de la TryR, los péptidos proceden de la segunda subunidad de la enzima y las mutaciones necesarias se realizaron con *tLEaP*.

Los péptidos se situaron en una caja rectangular de 4000 aguas TIP3P²² con una separación de 15 Å a los lados de la caja y se neutralizó añadiendo un ion de sodio. Los distintos sistemas péptido-monómero se situaron en una caja de 200000 moléculas de agua TIP3P de media, y con una distancia de 15 Å a los lados de la caja. Además, para neutralizar las cargas se añadieron 11 iones de Na⁺.

Definición de residuos no naturales y cofactores

Para el aminoácido no natural de Nle presente en los péptidos simulados con cierre amida y para aquellos aminoácidos que forman parte del cierre covalente (GLA, LYA), así como para el cofactor FAD en su forma reducida, se construyeron los archivos PREP. Este tipo de archivos son necesarios para que el programa AMBER¹⁹ reconozca a grupos prostéticos y moléculas orgánicas, no presentes en sus librerías. Así, en primer lugar se calcularon las distribuciones de cargas de estos residuos (cargas RESP), ajustando el potencial electrostático molecular calculado cuánticamente (RHF 6-31 G*/3-21G*) a un modelo de carga puntual usando la metodología RESP²³ en Gaussian²⁴. Por último, se editaron los archivos PREP manualmente, introduciendo en ellos las cargas anteriormente calculadas. Los

archivos *frmod* para el cofactor FAD fueron obtenidos de la base de parámetros de AMBER de Bryce y colaboradores.²⁵

Simulaciones de dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular se llevaron a cabo empleando el módulo *pmemd.cuda* de la suite de programas AMBER14¹⁹, usando el campo de fuerzas ff14SB²⁶. Se aplicaron condiciones de límite periódico y las interacciones electrostáticas se trataron usando el método PME (*Particle Mesh Ewald*) con un espaciado de red de 1 Å. La distancia de *cutoff* para las interacciones no enlazantes fue de 10 Å para los péptidos y de 15 Å para los complejos péptido-proteína. Se aplicó el algoritmo SHAKE a todos los enlaces que comprometen hidrógenos en un tiempo de integración de 2.0 fs. Así, primero las moléculas de disolvente y los contra-iones fueron sometidos previamente a una minimización energética y se redistribuyeron alrededor del soluto restringido posicionalmente ($25 \text{ Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-2}$) durante 50 ps de dinámica molecular a temperatura y presión constantes (300 K y 1 atm, respectivamente). A continuación, estas restricciones armónicas iniciales fueron gradualmente reducidas hasta su total eliminación en series de minimizaciones energéticas progresivas. Los sistemas resultantes fueron calentados de nuevo desde 100 a 300 K durante 20 ps y equilibrados en cinco ciclos durante 1 ns de dinámica molecular. Finalmente se llevaron a cabo simulaciones de 100 ns a temperatura (300 K) y presión (1 atm) constantes, donde los sistemas de coordenadas fueron grabados cada 2 ps para un posterior análisis. Las simulaciones de DM se llevaron a cabo usando una arquitectura GPU en una tarjeta gráfica NVIDIA GeForce GTX780.

Análisis y visualización de los datos de las simulaciones de DM

El cálculo de los distintos parámetros geométricos analizados en las simulaciones de DM: distancias interatómicas (Å), ángulos de giro (Å), ángulos dihedros (grados), porcentaje de helicidad α , etc. se llevaron a cabo con el módulo *ptraj* de AMBER²⁶. Las estructuras tridimensionales y las trayectorias fueron visualizadas usando el programa PyMOL²⁷.

Protocolos de docking

Se hizo uso de los programas de *docking* AutoDock Vina²⁸ y Glide^{29,30} (implementado en Schrödinger, versión 9.2). En todos los casos se llevó a cabo un *docking* flexible para el ligando y rígido para el receptor (monómero de *Li-TryR*). Las

estructuras prototipo de los ligandos se dibujaron en ChemBioDraw14.0, se exportaron en forma de códigos SMILES y se obtuvieron sus estructuras 3D usando el servidor CORINA3D.³¹ Posteriormente, el resto de derivados se construyó con el módulo builder de PyMOL²⁷. Por otro lado, la estructura de *Li-TryR* empleada fue la misma que para los cálculos de simulaciones de DM (PDB 2JK6).

AutoDock Vina.²⁸ A partir de las coordenadas 3D de los ligandos y el receptor en forma de archivos PDB, se obtuvieron los archivos PDBQT en los que se recogen también las cargas (en este caso Gasteiger) de los átomos. El *docking* se llevó a cabo utilizando los parámetros estándar de AutoDock Vina en una caja de 30x30x30 Å de tamaño y centrada en la interfaz de dimerización de *Li-TryR* (residuos 436-445). Los resultados de *docking* fueron priorizados en base al valor de 'afinidad' (kcal mol⁻¹) y analizados visualmente.

Glide (Schrödinger).^{29,30} Se empleó la interfaz gráfica Maestro de Schrödinger. Los ligandos fueron modelados empleando el programa *LigPrep* a partir de sus códigos SMILES. Para el receptor se emplearon las coordenadas del monómero de *Li-TryR* y se trató en primer lugar con el módulo *Wizard*. Se completaron todos los hidrógenos y enlaces disulfuro, y se minimizaron sólo los primeros usando el campo de fuerzas OPLS. Se definió una caja de tamaño 30x30x30 Å y se empleó una precisión estándar para el *docking* (SP). Para cada ligando se seleccionaron las mejores 5 poses en base a su función de *scoring*. Por último, se llevó a cabo un análisis visual de los resultados.

5.7.2. Cribado virtual

Para la campaña de cribado virtual se utilizaron dos quimiotecas: la quimioteca del IQM (Instituto de Química Médica), que cuenta con aproximadamente 2000 compuestos sintetizados y/o diseñados en nuestros laboratorios en los últimos años y la quimioteca del NCI (*National Cancer Institute*)³², que cuenta con cerca de 250250 compuestos.

El cribado virtual se llevó a cabo con el programa CRDOCK³³ de la plataforma VSDMIP³³. Así, en primer lugar se enriquecieron las dos bases de datos anteriores aplicando como filtro los tres puntos farmacofóricos contruidos a partir del modo de unión del péptido prototipo **P2** y descrito en el Capítulo 3: (1) un grupo cargado positivamente (donde se encuentra la cadena lateral de la Lys2), (2) un donador de

enlace de hidrógeno y lipófilo (bolsillo donde se localiza la Gln5), y (3) una región lipófila (donde se coloca la Ile9).

Del filtrado las dos quimiotecas se seleccionaron 40000 moléculas para la campaña de *docking*. Para la exploración del espacio conformacional de los ligandos, se generó una librería de conformeros con el programa ALFA³⁴ y posteriormente se llevó a cabo el *docking* usando el programa CRDOCK³³. Se seleccionaron las mejores 100 soluciones y del análisis visual de los resultados, se seleccionaron 5 compuestos pertenecientes a la quimioteca del NCI y 12 de la quimioteca del IQM.

5.8. Dicroísmo circular

Adquisición de los espectros

Los espectros de dicroísmo circular se adquirieron en disolución acuosa con un 30% de TFE^{35,36}. Las concentraciones de las muestras fueron determinadas mediante la medida de Abs a 210 nm de las muestras evaluadas en CD. Se llevaron a cabo medidas entre 200 y 250 nm, a 4 °C y usando un paso óptico de 1 mm en cubeta de cuarzo. El programa de adquisición de datos empleado fue el *Spectrum Measurement* (Jasco, Easton, MD, USA). Los experimentos se llevaron a cabo a una velocidad de barrido de 50 nm·min⁻¹, un tiempo de respuesta de 2 s y 1 nm de ancho de banda. Los espectros obtenidos son el promedio de 4 barridos, en los que se corrigió la línea base con un blanco.

Tratamiento de datos y cálculo de helicidad experimental y teórica

El grado de helicidad experimental calculado en porcentaje, se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Baldwin y colaboradores³⁷.

5.9. Ensayos de estabilidad proteolítica

Para comparar la estabilidad metabólica de los péptidos más representativos de cada tipo se ha seleccionado la proteinasa K (Aldrich), ya que es una proteasa de amplio espectro.

Siguiendo el procedimiento descrito por S. Gellman³⁸, se ha determinado la estabilidad frente a proteinasa K en disolución utilizando como *buffer* TBS (pH = 7.6,

Aldrich) a una concentración de 50 μM final de péptido y 10 $\mu\text{g/mL}$ final de proteinasa K. Se prepara una disolución *stock* 100 μM de péptido en TBS con un 10% de DMSO (para mejorar la solubilidad de los péptidos en el *buffer*). Para cada reacción de proteólisis se mezclan 250 μL de la disolución *stock* de péptido con 208 μL de TBS. A continuación, se añaden 42 μL de la disolución *stock* de proteasa, se mezcla bien la disolución resultante y se deja que la reacción de proteólisis ocurra a temperatura ambiente. La reacción se quenchea a los tiempos deseados con la adición de 100 μL de TFA al 1% en agua/ CH_3CN 1:1. Para el seguimiento de la reacción, se inyectan 100 μL de la reacción resultante quencheada en el HPLC-analítico, cuantificándose la cantidad de péptido presente en la mezcla de reacción mediante la integración del pico cromatográfico a 214 nm. El experimento se realiza por triplicado y se determina el tiempo de vida media gracias a un ajuste de decaimiento exponencial entre el porcentaje de péptido sin hidrolizar frente al tiempo, empleando para ello el programa GraphPad Prism³⁹.

5.10. Ensayos biológicos

Los ensayos biológicos de todos los compuestos sintetizados en este trabajo se realizaron en el laboratorio del Prof. Antonio Jiménez (Universidad de Alcalá: UAH).

5.10.1. Ensayo de inhibición de la actividad oxidoreductasa de la *Lt-TryR*

Se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Hamilton y colaboradores⁴⁰, en el que se acopla el proceso de reducción del sustrato de la enzima (tripanotión oxidado, TS_2) a partir del cofactor NADPH, con la reducción del ácido ditronitrobenzoico (DTNB) para generar ácido tionitrobenzoico (TNB), que se detecta por espectroscopía de absorción, midiendo a 412 nm. Así, por cada molécula de NADPH que se reduce, se generan dos moléculas de ácido tionitrobenzoico (TNB).

El ensayo se lleva a cabo incubando la enzima (7 nM) en presencia de los péptidos disueltos en DMSO. Concentraciones finales: 75.00, 37.80, 18.75, 9.30, 4.68, 2.34, 1.17, 0.58 y 0.29 μM en una placa multipocillo (volumen final de ensayo de 200 μL) durante 10 min en ausencia de NADPH y a 26 °C, en las siguientes condiciones: HEPES 40 nM (pH 6.9-7.0), EDTA 1 mM, NADP^+ 30 μM y DTNB 25 μM . La reacción comienza tras añadir 50 μL de una disolución de tripanotión oxidado (1 μM) y NADPH (150 μM). El curso de la reacción es seguido durante 60 min, registrando medidas de

absorbancia cada minuto. Las medidas puntuales de inhibición de la actividad de la enzima se realizó a las concentraciones de 15 μM (péptidos grapados) y 11.8 μM (análogos lineales). La concentración final de DMSO y glicerol en el ensayo es de 1.75% y 0.025% en volumen, respectivamente. Los valores de la concentración CI_{50} , se determinaron a partir de las pendientes a tiempos iniciales (0 - 20 min), tras normalizar con respecto al control sin péptido (sólo DMSO), usando el programa GraFit 6⁴¹ (Erithacus Software Limited).

5.10.2. Ensayo de inhibición de la dimerización de la Li-TryR

Este ensayo ha sido implementado recientemente por el laboratorio del Prof. Antonio Jiménez (Universidad de Alcalá).⁴² Se basa en la detección ELISA en placa multipocillo (96 posiciones) del porcentaje de dímero en presencia de inhibidores de la dimerización. Cada uno de los monómeros de la enzima presenta un *tag* de T7, y además un *tag* FLAG o un *tag* HIS. Una vez co-expresados los monómeros co-expresados en la misma bacteria, se purifican usando una matriz de Ni-NTA y se inmovilizan en una placa de poliestireno tapizada con anticuerpo *anti*-FLAG M2 (SIGMA). Tras lavar, sólo quedarán anclados a la placa los heterodímeros HIS/FLAG, los cuales son detectados en el ensayo con un anticuerpo anti-HIS marcado con peroxidasa (HRP).

Preparación de la placa. En cada pocillo de placa se siembra anti-FLAG M2 (40-60 μg) disuelto en PBS (60 μL). Posteriormente se incuba 2 h en cámara húmeda a temperatura ambiente, se lava con TTBS (3 x 200 μL) y se bloquean las posiciones reactivas de la placa con BSA al 3% (200 μL) durante 12 h. a 4 °C.

Procedimiento: El volumen final de ensayo es 200 μL . El ensayo consta de dos controles: control de carga de proteína (*tag*-T7), y control de actividad (ausencia de péptido, sólo DMSO). A una placa tapizada con anticuerpo anti-FLAG, se añade el tampón de dimerización (200 μL , proteína 400 nM, Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 300 mM) y el péptido (disuelto en DMSO al 75% en agua; concentraciones finales: 93.75, 48.88, 22.44 y 11.72 μM). La placa se incuba durante 16 h. a 37 °C con agitación orbital constante. Posteriormente se lava con TTBS (10 x 200 μL), se añade anticuerpo anti-HIS-HRP en TTBS con leche desnatada al 5% (200 μL , 1:5000) y se incuba durante 1 h. a temperatura ambiente. Se lava con TTBS (10 x 200 μL , 30 s.), se añade el sustrato cromóforo OPD (100 μL) y se incuba a temperatura ambiente durante 10 min

protegido de la luz. La reacción se para con H_2SO_4 (100 μL 0.5 M). La lectura se realiza en un espectrofotómetro a la longitud de onda de 490 nm.

5.10.3. Ensayos de inhibición frente a los parásitos

Protocolo para el cálculo de la CI_{50} en promastigotes

En primer lugar, se siembran placas p96 con 200 μL de promastigotes a una concentración de $2 \cdot 10^6$ promastigotes/mL. Se tratan con 1 μL del compuesto y se resuspende con una pipeta p200 para asegurar una buena mezcla (Normalmente, se solubilizan los compuestos a 5 mM en DMSO, por lo que al tratar con 1 μL se obtiene una concentración final de 25 μM . Para hacer una CI_{50} se hacen diluciones seriadas con DMSO partiendo de la concentración más alta que se puede tener tratando con 1 μL de un *stock* a 5 mM que es 25 μM). A continuación, la placa se sella con *parafilm* y se incuba a 26 °C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se añaden 2 μL de una disolución de yoduro de propidio a 1 mg/mL, de manera que queda a una concentración final de 10 $\mu\text{g/mL}$. Finalmente, se lee la placa en el citómetro de flujo.

Protocolo para la determinación de la CI_{50} en amastigotes

En primer lugar, se siembran placas p96 con 200 μL de amastigotes a una concentración de 10^6 amastigotes/mL. Se tratan con 1 μL del compuesto y se resuspende con la pipeta p200 para asegurar una buena mezcla. A continuación, la placa se sella con *parafilm* y se incuba a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se añaden 2 μL de una solución de yoduro de propidio a 1 mg/mL, de manera que queda a una concentración final de 10 $\mu\text{g/mL}$. Finalmente, se lee la placa en el citómetro de flujo.

Protocolo para la determinación de la CI_{50} en monocitos (THP-1)

En primer lugar, se siembran placas p96 con 200 μL de monocitos a una concentración de 400.000 monocitos/mL. Se tratan con 1 μL del compuesto y se resuspende con la pipeta p200 para asegurar una buena mezcla. A continuación, la placa se sella con *parafilm* y se incuba a 37 °C y un 5 % CO_2 durante 24 horas. Pasado este tiempo, se añaden 2 μL de una solución de yoduro de propidio a 1 mg/mL, de manera que queda a una concentración final de 10 $\mu\text{g/mL}$ y, por último, se lee la placa en el citómetro de flujo.

5.11. Bibliografía

1. Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I., Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.
2. Christensen, T., A qualitative test for monitoring coupling completeness in solid phase peptide synthesis using chloranil. *Acta Chem. Scand.* **1979**, *33*, 763-766.
3. Pedersen, S. L.; Pernille Tofteng, A.; Malik, L.; Jensen, K. J. Microwave heating in solid-phase peptide synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1826-1844.
4. Grieco, P.; Gitu, P. M.; Hruby, V. J. Preparation of 'side-chain-to-side-chain' cyclic peptides by Allyl and Alloc strategy: potential for library synthesis. *J. Peptide Res.* **2001**, *57*, 250-256.
5. Murage, E. N.; Gao, G.; Bisello, A.; Ahn, J. M. Development of potenet glucagon-like peptide-1 agonists with high enzyme stability via introduction of multiple lactam bridge. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6412-6420.
6. Robinson, A. J.; Elaridi, J.; Van Lierop, B. J.; Mujcinovic, S.; Jackson, W. R., Microwave-assisted RCM for the synthesis of carbocyclic peptides. *J. Pept. Sci.* **2007**, *13*, 280-285.
7. Illesinghe, J.; Gou, C. X.; Garland, R.; Ahmed, A.; van Lierop, B.; Elaridi, J.; Jackson, R. F. W.; Robert, A., Metathesis assisted of cyclic peptides. *Chem. Commun.* **2009**, *3*, 295-297.
8. Ahn, Y. M.; Yang, K.; Georg, G. I., A convenient method for the efficient removal of ruthenium byproducts generated during olefin metathesis reactions. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1411-1413.
9. Maynard, H. D.; Grubbs, R. H., Purification technique for the removal of ruthenium from olefin metathesis reaction products. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4137-4140.
10. Paquette, L. A.; Schloss, J. D.; Efremov, I. I.; Fabris, F.; Gallou, F.; Mendez-Andino, J.; Yang, J., A convenient method for removing all highly-colored byproducts generated during olefin metathesis reactions. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1259-1261.
11. Olivos, H. J.; Alluri, P. G.; Reddy, M. M.; Salony, D.; Kodadek, T. Microwave-Assisted Solid-phase synthesis of peptoids. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 4057-4059.

12. Lee, J. H.; Zhang, Q.; Jo, S.; Chai, S. C.; Oh, M.; Im, W.; Lu, H.; Lim, H. S. Novel pyrrolopyrimidine-based α -helix mimetics: cell-permeable inhibitors of protein-protein interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 676-679.
13. Lee, J. H.; Lim, H. S. Solid-phase synthesis of tetrasubstituted pyrrolo[2,3-d]pyrimidines. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 4229-4235.
14. Ebeid, M. Y.; Mikhael, A. N.; El-Moghazy Aly, S. M.; Eissa, A. A. H. Synthesis and antitumor activity of some 4-[4-[4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-carbonyl]acridin-9-ylamino]benzenesulfonamide derivatives. *Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ.* **1994**, *32*, 361-368.
15. Atwell, G. J.; Cain, B. F.; Baguley, B. C.; Finlay, G. J.; Denny, W. A. Potential antitumor Agents. 43. Synthesis and biological activity of dibasic Q-Aminoacridine-4-carboxamides, a new class of antitumor agent. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 1481-1485.
16. Yajima, H.; Fujii, N. in 'The Peptides,' eds. Gross, E.; Meienhofer, J. *Academic Press, Inc. New York.* **1983**, *5*, 65.
17. Varney, M. D.; Marzoni, G. P.; Palmer, C. L.; Deal, J. G.; Webber, S.; Welsh, K. M.; Bacquet, R. J.; Bartlett, C. A.; Morse, C. A.; Booth, C. L. J.; Herrmann, S. M.; Howland, E. F.; Ward, R. W.; White, J. J. Crystal-structure-based design and synthesis of benz[cd]indole-containing inhibitors of thymidylate synthase. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 663-676.
18. Familiar, O.; Munier-Lehmann, H.; Negri, A.; Gago, F.; Douguet, D.; Rigouts, L.; Hernandez, A.; Camarasa, M. J.; Perez-Perez, M. J. Exploring Acyclic Nucleoside Analogues as Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* Thymidylate Kinase. *Chem. Med. Chem.* **2008**, *3*, 1083-1093.
19. Case, D. A.; Berryman, J. T.; Betz, R. M.; Cerutti, D. S.; Cheatham III, T. E.; Darden, T. A.; Duke, R. E.; Giese, T. J.; Gohlke, H.; Goetz, A. W.; Homeyer, N.; Izadi, S.; Janowski, P.; Kaus, J.; Kovalenko, A.; Lee, T. S.; LeGrand, S.; Li, P.; Luchko, T.; Luo, R.; Madej, B.; Merz, K. M.; Monard, G.; Needham, P.; Nguyen, H.; Nguyen, H. T.; Omelyan, I.; Onufriev, A.; Roe, D. R.; Roitberg, A.; Salomon-Ferrer, R.; Simmerling, C. L.; Smith, W.; Swails, J.; Walker, R. C.; Wang, J.; Wolf, R. M.; Wu, X.; York, D. M.; Kollman, P. A. (2015), AMBER 2015, University of California, San Francisco.
20. Baiocco, P.; Colotti, G.; Franceschini, S.; Ilari, A., Molecular Basis of Antimony Treatment in Leishmaniasis. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2603-2612.

22. Aqvist, J., Ion-water interaction potentials derived from free energy perturbation simulations. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 8021-8024.

23. Bayly, C. I.; Cieplak, P.; Cornell, W.; Kollman, P. A., A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 10269-10280.

24. URL: www.gaussian.com

25. URL: www.pharmacy.manchester.ac.uk/bryce/amber/

26. Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A., A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5179-5197.

27. URL: www.pymol.org

28. URL: <http://vina.scripps.edu/>

29. Halgren, T. A.; Murphy, R. B.; Friesner, R. A.; Beard, H. S.; Frye, L. L.; Pollard, W. T.; Banks, J. L. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1750-1759.

30. Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Shaw, D. E.; Francis, P.; Shenkin, P. S. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739-1749.

31. URL: https://www.molecular-networks.com/online_demos/corina_demo

32. URL: <http://cactus.nci.nih.gov/index.html>

33. Cortés-Cabrera, A.; Klett, J.; Dos Santos, H. G.; Perona, A.; Gil-Redondo, R.; Francis, S. M.; Priego, E. M.; Gago, F.; Morreale, A. CRDOCK: An ultrafast multipurpose protein-ligand docking tool. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 2300–2309. Descargas en URL: farmamol.uah.es

34. Klett, J.; Cortés-Cabrera, A.; Rubén Gil-Redondo, R.; Gago, F.; Morreale, A. ALFA: automatic ligand flexibility assignment. *J. Chem. Inf. Model.*, **2014**, *54*, 314-323.

35. Roccatano, D.; Colombo, G.; Fioroni, M.; Mark, A. E., Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: A molecular dynamics study. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 12179-12184.
36. Buck, M., Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins. *Q. Rev. Biophys.* **1998**, *31*, 297-355.
37. Luo, P.; Baldwin, R. L., Mechanism of Helix Induction by Trifluoroethanol: A Framework for Extrapolating the Helix-Forming Properties of Peptides from Trifluoroethanol/Water Mixtures Back to Water. *Biochemistry* **1997**, *36*, 8413-8421.
38. Boersma, M. D.; Haase, H. S.; Peterson-Kaufman, K. J.; Lee, E. F.; Clarke, O. B.; Colman, P. M.; Smith, B. J.; Horne, W. S.; Fairlie, W. D.; Gellman, S. H. Evaluation of diverse alpha/beta-backbone patterns for functional alpha-helix mimicry: analogues of the Bim BH3 domain. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 315-323.
39. URL: <http://www.graphpad.com/demos/>
40. Hamilton, C. J.; Saravanamuthu, A.; Eggleston, I. M.; Fairlamb, A. H., Ellman's-reagent-mediated regeneration of trypanothione in situ: substrate-economical microplate and time-dependent inhibition assays for trypanothione reductase. *Biochem. J.* **2003**, *369*, 529-537.
41. URL: www.erithacus.com/grafit
42. Toro, M.A.; Sánchez-Murcia, P.A.; Moreno, D.; Ruiz-Santaquiteria, M.; Alzate, J.F.; Negri, A.; Camarasa, M.J.; Gago, F.; Velázquez, S.; Jiménez-Ruiz, A. Probing the Dimerization Interface of *Leishmania infantum* Trypanothione Reductase with Site-Directed Mutagenesis and Short Peptides. *ChemBioChem.* **2013**, *14*, 1212-1217.